SERIE A, N° 4586
N° D'ORDRE : 5433

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marius PTAK

Maître-Assistant à l'Ecole Normale Supérieure de Saint-Cloud

PREMIÈRE THÈSE

Etude par voie optique et par résonance paramagnétique électronique de quelques acides aminés aromatiques

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

12 OCT 1965

Soutenues le devant la Commission d'examen

MM. P. GRIVET — Président
J. TONNELAT
Ch. SADRON
P. DOUZOU — Examinateurs

SERIE A, N° 4586
N° D'ORDRE : 5433

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marius PTAK

Maître-Assistant à l'Ecole Normale Supérieure de Saint-Cloud

PREMIÈRE THÈSE

Etude par voie optique et par résonance paramagnétique électronique de quelques acides aminés aromatiques

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le devant la Commission d'examen

MM. P. GRIVET — Président
J. TONNELAT, Ch. SADRON, P. DOUZOU — Examinateurs

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen.... M. ZAMANSKY

MM.	BRELOT	T Analyse supérieure
	PRENANT	T Anatomie et histologie comparée
	GRASSE	T Evolution des êtres organisés
	PREVOST	T Chimie organique
	WYART	T Minéralo & cristallo
	TEISSIER	T Zoologie
	MANGENOT	T Biologie végé. (Orsay)
	AUGER	T Physique quantique et relativité
	MONNIER	T Physiologie générale
	PIVETEAU	T Paléontologie
	ROCARD	T Physique ENS
	CARTAN	T Mathématiques ENS
	LAFFITTE	T Chimie générale
	N...	T Géométrie supérieure
	COULOMB	T Physique du globe
Mlle	COUSIN	T Biologie animale SPCN
	CHRETIEN	T Chimie minérale
	BOCQUET	T Zoologie
	KASTLER	T Physique ENS
	EPHRUSSI	T Génétique
	RIVIERE	T Géologie SPCN & sédiment (Orsay)
	GAUTHERET	T Biologie végétale PCB
	LUCAS R.	T Recherches physiques
	THOMAS A.	T Biologie cellulaire
	ARNULF	T Optique appliquée
	MORAND	T Physique enseignement
	SOLEILLET	T Physique PCB
	FORTIER	T Mécanique exp. des fluides
	DRACH	T Zoologie
	QUENEY	T Météo. & dynamique atmos.
	GALLIEN	T Embryologie
	EICHORN	T Botanique
	DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN
Mlle	CAUCHOIS	T Chimie physique
	THELLIER	T Physique du globe
	L'HERITIER	T Biologie générale Orsay
	GRIVET	T Radioélectricité Orsay
	PONCIN	T Mécanique générale
	DU BREIL	T Arith. & théorie des nombres
	QUELET	T Chimie organique
	CAGNIARD	T Géophysique appliquée
	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire
	CUVILLIER	T Micropaléontologie
	JUNG	T Géologie
	TRILLAT	T Microscopie et diffracélec.
	WIEMANN	T Chimie organ. & structu.
	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
	VASSY	T Physique de l'atmosphère
	DESTOUCHES	T Théorie physique
	AMIEL	T Chimie générale
	HOCART	T Minérall. & cristal.
	J.P. MATHIEU	T Physique optique
	COUTEAUX	T Cytologie
	MAY	T Zoologie
	CHOQUET	T Théorie des fonctions et topologie
	FELDMANN	T Biologie végétale marine
	GUINIER	T Physique des solides (Orsay)
	JOST	T Physiologie comparée
	FORTET	T Calcul des probabilités et physique mathématiques
	SCHWARTZ	T Calcul dif. & Intégral.
	CHOUARD	T Physiologie végétale
	MALAVARD	T Aviation (technique aéron.)
	NORMANT	T Synthèse organique
	BENARD	T Chimié minérale
	BUVAT	T Botanique ENS
	DUGUE	T Statistique mathématiques
	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
	ULRICH	T Physiologie végé. appli.
	MARECHAL	T Optique théo. & appli.
	KIRRMANN	T Théories chimiques
	CHADEFAUD	T Botanique
Mlle	LE BRETON	T Physio. de la nutrition
	LELONG	T Appli. de l'ana. à la géom.
	DEVILLERS	T Anatomie & histo. compa.
	EHRESMANN	T Topologie algébrique
MM.	FRANCON	T Physique SPCN
	GLANGEAUD	T Géogra. phys. & géol.
	DODEMENT	T Mathématiques MGP
	PISOT	T Technique math. de la physi.
	ROCH	T Géologie
	SCHATZMANN	T Astrophysique
	TERMIER	T Géologie générale
	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
	LENNUIER	T Physique MGP
	RIZET	T Génétique Orsay
	ROUTHIER	T Géologie appliquée
Mme	TONNELAT	T Physique théorique
	DIXMIER	T Mathématiques MPC
	SOUCHAY	T Chimie générale
	AIGRAIN	T Electrotechn. géné.
	BRUSSET	T Chimie systématique
	LEVY M.	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme	CHAIX	T Chimie biologique
Mme	HUREL PY	T Biologie végétale PCB
	PANNETIER	T Chimie générale
	BRUN	T Mécanique des fluides I
	LEDERER	T Chimie biologiaue (Orsay)
Mme	DUBREIL	T Mathématiques (agréga.)
Mme	LELONG	T Math. II ENS
	BELLAIR	T Géologie SPCN
	COTTE	T Physique électricité
	DUBOIS J.E.	T Chimie organique
	LAMOTTE	T Zoologie ENS
	MICHEL A.	T Chimie minérale Orsay
	OLMER	T Energétique générale
	ROUAULT	T Electricité (Orsay)
	GAUTHIER	T Mécanique appliquée
	BARCHEWITZ	T Chimie physique
	BROSSEL	T Physique atomique
	BUSER	T Physiologie comparée
	CAMUS	T Physio. végé.
	CASTAING	T Physique II thermo. (Orsay)
	CURIEN	T Minéralo & cristal.
	MOYSE	T Physio. végé. (Orsay)
Mme	CHARNIAUX-COTTON	T Evolution des êtres organisés
	POSSOMPES	T Zoologie
	PULLMANN	T Chimie quantique
	TEILLAC	T Physique nuc. et radioactivité (Orsay)
	TONNELAT	T Bio. physico. chim. (Orsay)
	VILLE	T Econométrie
	WILLEMART	T Chimie PCB
	DODE	T Chimie (Orsay)
	FREYMANN	T Recherches physiques
	GUINOCHET	T Biolo. végé. SPNC (Orsay)
	ROLLET	T Chimie minérale
Mlle	JOSIEN	T Chimie SPCN
	CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes
	ARNOULT	T Electronique Orsay
	CHAPELLE	T Physique I (Orsay)
	DELANGE	T Mathématiques I (Orsay)
	DENY	T Mathé. géné. (Orsay)
	GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides
	LUCAS	T Géologie
	ALLARD	T Chimie physique
	BERTHELOT	T Physique des particules fondamentales (Orsay)
	BRICARD	T Météor. et physique de l'at.
Mme	ALBE	T Psycho. physio.
	FESSARD	
	FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay)
	JULIA M.	T Etudes des moléculaires complexes
	LENDER	T Biologie animale SPCN Orsay
	MAGAT	T Physico chimie des radio éléments
Mlle	QUINTIN	T Electrochimie
	MONOD	T Chimie du métabolisme
	BENOIT	T Physio. animale Orsay
	DE POSSEL	T Analyse numérique
	CHARLOT	T Chimie analytique
	LEMEE	T Ecologie végétale Orsay

MM.	GUERIN	T Chimie MPC Orsay
	CHATELET	T Chimie PCB
	JEAN	T Physio nucléaire Orsay
	MATTLER	T Physique SPCN
	BERGERARD	T Zoologie Orsay
	BERTEIN	T Electronique Orsay
	BOUISSIERES	T Radiochimie
Mme	COUTURE	T Thermo et méca. physique
	ELLEMBERGER	T Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
	FRANC	T Biologie animal PCB
	SCHNELL	Botanique tropicale
	STLKOWSKI	T Physiologie végétale
	ACHER	T Chimie biologiques
	BAUDOIN	T Biologie animal PCB
	BEAUMONT	Biologie animal SPCN
	BLAMONT	Géophysique ionosphère
	BOUREAU	T Botanique
	CURIE D.	Physique MGP
	DURAND	T Géologie
	DELGA	
	FREON	T Chimie organique Orsay
	HELLER	T Physiologie végétale
	TORTRAT	T Calcul des probabilités
	CAILLEUX	T Géologie SPCN
	MAGNAN	Physique électricité
	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appli. à la chimie théo. & à la phy. nucléaire
Mlle	FOURCROY	Biologie végétale SPCN
Mme	CHOQUET	Mécanique analytique et méca. céleste
	BRUHAT	
Mlle	VEIL	T Physiologie générale
	LWOFF	T Microbiologie
	SIESTRUNCK	T Méca. phys. & expérimentale
	LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
	BROCHARD	T Physique PCB (Orsay)
	CABANNES	T Mécanique générale
	LESIEUR	T Math. I (Orsay)
	MAZET	T Méca. géné. (Orsay)
	CAIRE	Géogra. physique et géo. dynami.
	COMOLET	Méca. des fluides
	CORABOEUF	T Physio. animale (Orsay)
	DELLOUE	T Physique de l'exosphère
	GORENFLOT	Botanique II (Orsay)
	HOUILLON	Biologie animale PCB
	JULLIEN J.	Chimie SPCN (Orsay)
	MALGRANGE	T Technique mathé. de la phys. (Orsay)
	OLIVIER	Antropologie
	NOZERAN	T Botanique II (Orsay)
	BLANC-LAPIERRE	T Physique ENS (Orsay)
	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay)
	KAHANE	T Mathématiques (Orsay)
	SAMUEL	T Math. ENS féminines
	KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay)
	THIRY	T Méca. céleste
	ABELES	Physique SPCN
	AMAT	T Physique PCB
	AUBOIN	T Géologie
Mme	BENOIT-GUEUTAL	T Physique nucléaire et radio-activité (Orsay)
	BOUGIS	Biologie marine Villefranche/Mer
	BRUHAT	T Math. MPC
	BRUNN	T Géologie historique Orsay
	CHABBAL	T Physique MGP (Orsay)
	DEHEUVELS	T Math. propé.
	D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay)
	FURON	T Géologie SPCN
Mme	GANS	T Génétique
	GENEVES	Biologie végétale PCB
	GUILBERT	Physique CUS Orléans
	HUPE	T Pétrographie
	HOLLANDE	T Biolo. géné.
	LIONS	T Analyse numérique
	MAITTE	T Chimie PCB
	MEYER	Physique propé.
	NICOLAS	Géologie appliquée
	PANIGEL	Biologie générale
	RAVIER	Pétrographie

MM.	ROSEAU	T Méca. théorique des fluides
	ROUBINE	Electronique
	SILBER	T Chimie PCB
	UEBERSFELD	T Electronique
	YVON	T Théories physiques
	HERVE	T Mathématiques
	NERON	T Math. MPC (Orsay)
Mme	PECKER	T Astrophysique
	WIMEL	
	BALKANSKY	Physique MPC
	LE CORRE	T Electricité
	DELCROIX	T Physique théorique (Orsay)
	GOURDIN	Physique théorique (Orsay) des hautes énergies
	LEHMANN	T Phys. exp. des hautes énergie
	NATAF	T Physique nucléaire et radio-activité (Orsay)
	ECHALIER	Biologie animale PCB
	BARRAUD	Physiolo. cellulaire
	LIORET	Physiologie végé. Orsay
	DARS	Géologie structurale & géolo appli.
	CAMEFORT	T Botanique (agrégation)
	VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle
	BLAQUIERE	Electronique (Orsay)
	ARNOUS	T Physique théorique
	TATIBOUET	Chimie (CSU Orléans)
	MALLIAVIN	T Math. Propé. (Orsay)
	GAUDEMAR	Chimie propé.
	PEREZ Y JORBA	Physique exp. des hautes énergies (Orsay)
	DAVID	T Chimie (agrégation Orsay)
	BROUSSE	T Mécanique théorique
	ROSCH	T Astronomie
	GUY	T Physique expérimentale
	LAZARD	Math. MPC
	MOREL P.	Physique MPC
	ARSAC	Programmation
	LEFEBVRE	Chimie MPC
	CHAPEVILLE	Biochimie
	BENOIT	Physique CPEM
	RIO	Chimie CPEM
	JAUZEIN	Géologie ENS
	PREVOST G.	BV CPEM
	FAVARD P.	BA CPEM
	VILKAS	Chimie CPEM
Mlle	FICINI	Chimie CPEM
	LEQUEUX	Astronomie
	COHEN	Physique MPC
	TANNOUDJI	
	TAVERNIER	Physique PEM
Mme	ROIZEN	Physique PEM
	DURAND M.	BA SPCN
	PASCAUD	Physiologie
Mme	PETIT	BA CPEN
	BROUSSE	Géologie Orsay
	CAGNIAC	Physique agrégation Orsay
	LEBERRE	Zoologie (Orsay)
	SCHEFFER	Microbiologie (Orsay)
	de GENNES	Physique des solides (Orsay
	RIOU	Physique nuclé. exp. Orsay
	CLAUSER	Chimie biolo. Orsay
	CHEVALIER	Physio. animale Orsay
	JANCOVICI	Physique atomique Orsay
	FALK-VAIRANT	Physique nucléaire Orsay
	FETIZON	Chimie propé. Orsay
	CERF	Mathématiques Orsay
	LURCAT	Physique
	RIGAUDY	Chimie SPCN
	SIGWALT	Chimie SPCN
	FOURNET	Electricité générale
	COLLONGUES	Chimie CPEN
	DUBERT	Biochimie
	LAVOREL	Biologie physico chimique
	MOREL F.	Physiologie comparée
	TALBOT	Génétique chimique
Mme	NOUGAREDE	Botanique
	FRANCOIS	Zoologie
	IVANOFF	Océanographie physique
	CADIOT	Chimie organique
	BARUCH	Physique propédeutique
	NOZIERES	Physique générale
	BOK	Physique propédeutique
	SLONIMSKI	Génétique

Secrétaire général... R. POULAIN

A mes parents.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0009

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la collaboration du Laboratoire de Physique de l'Ecole Normale Supérieure de Saint-Cloud et du Laboratoire de Biophysique du Muséum National d'Histoire Naturelle.

Je remercie très vivement, Monsieur le Professeur Charles SADRON, Directeur de ce dernier Laboratoire, pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé, pour les moyens qu'il a mis à ma disposition et l'intérêt qu'il a manifesté pour le sujet.

J'exprime ma plus vive reconnaissance à Monsieur Pierre DOUZOU, Sous-Directeur de ce même Laboratoire, qui a guidé et animé mon travail avec beaucoup de dynamisme. Son amicale compréhension des difficultés m'a aidé à réaliser un travail de recherche dans des circonstances matérielles parfois difficiles. Je l'en remercie encore une fois. Je remercie également tous mes collègues du Laboratoire de Biophysique : MM. C. ROPARS, C. HELENE, J. M. LHOSTE et tout particulièrement R. SANTUS, pour l'aide matérielle qu'ils m'ont apportée et le climat amical qu'ils ont su faire régner entre nous.

Je suis reconnaissant à tous mes collègues de l'Ecole Normale Supérieure de Saint-Cloud, en particulier à MM. R. VIOVY, M. ROUGEE et L. SOULIE, pour leurs conseils et leur soutien.

J'assure de mon amicale sympathie tout le personnel de cette Ecole, surtout M. R. OLLIVRY et M. DIMANI, pour une aide technique très efficace et aussi Melle. B. DELBROUCQ, pour l'aide patiente et dévouée qu'elle m'a apportée au cours de la rédaction.

Je remercie enfin Monsieur le Professeur P. GRIVET ainsi que Monsieur le Professeur J. TONNELAT qui ont bien voulu s'intéresser à mon travail et faire partie du jury de thèse.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

Chapitre I : - ETUDE THEORIQUE DE LA SPECTROSCOPIE ET DE LA PHOTOCHIMIE DES MOLECULES POLYATOMIQUES 5

I. 1. Absorption des radiations lumineuses par une molécule isolée 5
I. 2. Les états excités 8
I. 3. Etude de la désactivation 10
I. 4. Conclusion 15
I. 5. Cas des Biopolymères 15

Chapitre II : - RAPPELS SUR LA THEORIE DE LA R. P. E. METHODES EXPERIMENTALES 17

1ère Partie : Rappels sur la théorie de la R. P. E. 17

II. 1. Le paramagnétisme 17
II. 2. Le phénomène de résonance électronique 18

2ème Partie : Les méthodes expérimentales 22

II. 3. Etude expérimentale de la R. P. E. 22
II. 4. Autres montages expérimentaux 26

Chapitre III : - RESULTATS EXPERIMENTAUX - INTERPRETATION 31

1ère Partie : III. 1. Etude de l'absorption des acides aminés aromatiques des peptides et des protéines 33

2ème Partie : III. 2. Etude des états excités : Fluorescence et Phosphorescence 40

III. 2. A. Fluorescence 41

1. Fluorescence des acides aminés aromatiques 41
2. Influence du pH 43
3. Fluorescence des dérivés et des peptides 46
4. Cas des polypeptides et des protéines 50
5. Conclusion 52

III. 2. B. Phosphorescence 52

1. Problème des solvants 52
2. Phosphorescence des acides aminés 56
3. Phosphorescence des peptides et des protéines 67
4. Conclusion 72

Pages

3ème Partie : III. 3. Etude de la résonance magnétique de l'état triplet 73

III. 3. 1. Etude théorique de la résonance magnétique de l'état triplet 74

A. Etude qualitative 74
B. Etude quantitative 75

1. Cas d'une molécule isolée 75
2. Cas d'un ensemble de molécules orientées au hasard. 81

III. 3. 2. Problèmes expérimentaux 86

III. 3. 3. Etude expérimentale de la résonance magnétique de l'état triplet 88

A. Cas de quelques carbures aromatiques 89
B. Cas des acides aminés 96

1. Benzène 96
2. Toluène-Phénol 98
3. Phénylalanine-Tyrosine 98
4. Indole-Tryptophane 100
5. Durées de vie 102
6. Combinaisons d'acides aminés 104
7. Transfert d'énergie 104
8. Conclusion 106

4ème Partie : Etude de la photochimie des poudres microcristallines et des solutions 107

III. 4. A. Etude de la photochimie des acides aminés en solution organique 107

1. Photolyse des solutions organiques 107
2. Mécanisme de la photolyse 111
3. Conclusion 117

III. 4. B. Photolyse de la tyrosine et du tryptophane dans l'acide borique 118

III. 4. C. Photolyse des acides aminés et des protéines à l'état de poudres microcristallines 120

1. Photochimie du cristal moléculaire et des poudres microcristallines 120
2. Etude de quelques acides aminés 122
3. Cas des protéines 130
4. Conclusion 133

Chapitre IV : CONCLUSION - PERSPECTIVES 135

ETUDE PAR VOIE OPTIQUE ET PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE DE QUELQUES ACIDES AMINES ATOMATIQUES

INTRODUCTION

Le but de ce travail est de préciser quelques unes des propriétés spectroscopiques et photo-chimiques des acides aminés aromatiques, de certaines de leurs combinaisons et de quelques protéines. Les méthodes expérimentales utilisées pour cela étant la Résonance Paramagnétique Electronique (R. P. E.) et la spectroscopie d'émission.

L'étude optique de ces composés a déjà fait l'objet de nombreux travaux. En mettant en évidence les propriétés émissives particulières des acides aminés aromatiques, les premiers résultats de P. DEBYE et J. O. EDWARDS (1) ont suscité de fructueuses études. Parmi les plus importantes, il convient de citer celles de A. SZENT - GYÖRGYI (2), de G. WEBER (3), et de Iu. A. VLADIMIROV (4).

Par contre, les applications de la R. P. E. sont rares, sauf dans le domaine de l'action des radiations ionisantes où les travaux de M. GORDY et H. SCHIELDS (5) sont particulièrement importants.

Sur un plan pratique, les problèmes abordés au cours de ces différentes études : états excités, transfert d'énergie, photochimie, etc. . . , sont loin d'être entièrement résolus et il nous a paru intéressant d'en reprendre quelques points en associant la spectroscopie d'émission à la technique principale qui est la R. P. E. Notre programme d'expérimentation est basé sur les considérations suivantes :

1/ L'interaction des radiations électromagnétiques avec une molécule peut être envisagée à trois stades différents :

a) On s'adresse tout d'abord à la molécule "isolée", c'est-à-dire placée dans des conditions telles que les interactions avec le milieu environnant soient très faibles ou nulles. C'est le moyen de mettre en évidence des propriétés spécifiquement moléculaires.

b) On s'intéresse ensuite plus spécialement aux "interactions moléculaires". La nature et l'intensité de ces interactions sont des plus variées mais, dans tous les cas, la molécule garde une grande partie de son individualité.

c) On étudie enfin le cas où la molécule entre dans des associations ou des combinaisons au sein desquelles il devient difficile de distinguer ses

propriétés particulières. Ces combinaisons peuvent aller du plus simple (condensation de quelques molécules) au plus complexe (état cristallin ou état polymère). Il y a généralement apparition de "propriétés supra-moléculaires" spécifiques.

Une étude des propriétés moléculaires des acides aminés aromatiques telle que nous l'avons entreprise, constitue donc la première étape logique d'une étude progressive menant à la macromolécule qui est en fait la véritable "unité biologique".

2/ L'interaction des radiations électromagnétiques avec ces molécules permettra d'obtenir des renseignements de deux sortes :

a) renseignements sur la structure électronique de l'édifice moléculaire et sur les modifications qui résultent des interactions avec l'environnement.

b) renseignements sur les propriétés énergétiques de la molécule, c'est-à-dire sur le mode d'utilisation de l'énergie absorbée, dans un domaine qui va de l'infra-rouge à l'ultra-violet.

Pour une molécule l'excitation électronique et ses conséquences peuvent être schématisées par le cycle suivant :

α Absorption d'un photon. Cette absorption se traduit par une transition en deux états énergétiques quantifiés de la molécule. Toute transition électronique s'accompagne de changement dans les états vibrationnels et rotationnels.

β Existence de la molécule à l'état excité. En règle générale, la durée de vie des états excités est très brève ; de 10^{-9} à 10^{-3} s pour les états électroniques. (quelques secondes dans le cas particulier des états triplets). Diverses modifications peuvent néanmoins intervenir : conversion interne partielle de l'énergie, passage d'un état excité à un autre état excité, absorption d'un nouveau photon.

δ Désactivation. L'évolution de la molécule dépendra des propriétés électroniques de l'état excité atteint et de la nature de l'environnement. D'une façon générale la réactivité chimique est très augmentée. Si la molécule n'entre pas dans une combinaison, elle peut se désactiver de différentes manières :

- par un phénomène de conversion interne ou externe : le photon absorbé est fractionné et converti en énergie de vibration et de rotation.

- par un phénomène de transfert : le photon est transféré, avec ou sans conversion partielle, à une molécule voisine qui passe à son tour dans un état excité.

- par émission d'un photon d'énergie un peu plus faible sous forme de fluorescence ou de phosphorescence.

- par une modification photochimique, réversible ou non. L'isomérisation, la tautomérisation, l'éjection d'électrons et surtout la dissociation sont les mécanismes les plus courants.

Notre étude expérimentale reprendra avec plus ou moins de développements chacun des points qui viennent d'être énoncés.

3/ La R P E qui permet de détecter et d'identifier des espèces paramagnétiques aura des applications particulières :

L'application d'un champ magnétique à une molécule paramagnétique dans l'état S conduit à l'apparition de (2S+1) sous-niveaux. En respectant la règle $\Delta m = \pm 1$ il est possible d'induire des transitions entre ces sous-niveaux séparés par une énergie $E = h\nu = g\beta H$ où g est le facteur de Landé et β le magnéton de Bohr. C'est le principe de la résonance électronique. Pour qu'une molécule organique ne contenant pas d'ion des éléments de transition soit paramagnétique, il faut qu'elle possède un ou plusieurs électrons célibataires, c'est-à-dire qu'elle se trouve dans un état doublet $S = \frac{1}{2}$ (radical libre) ou triplet $S = 1$. L'état triplet est l'état électronique excité responsable de la phosphorescence ; les acides aminés aromatiques sont des émetteurs tout à fait privilégiés à ce point de vue. Quant aux radicaux, ils sont le plus souvent la conséquence d'une irradiation dans la bande d'absorption ultra-violette.

La détection des états triplets et des radicaux, l'étude des processus de formation de ces états, le problème du transfert de l'énergie, constitueront une partie de nos résultats.

Le schéma de la figure 1. résume les considérations que nous venons de faire et constitue donc notre plan de travail.

L'exposé comportera les chapitres suivants :

I. Etude théorique de la spectroscopie et de la photochimie des molécules biologiques.

II. Rappels sur la théorie de la R. P. E. Montages expérimentaux.

III. Résultats et interprétation.

IV. Perspectives - Conclusions

*

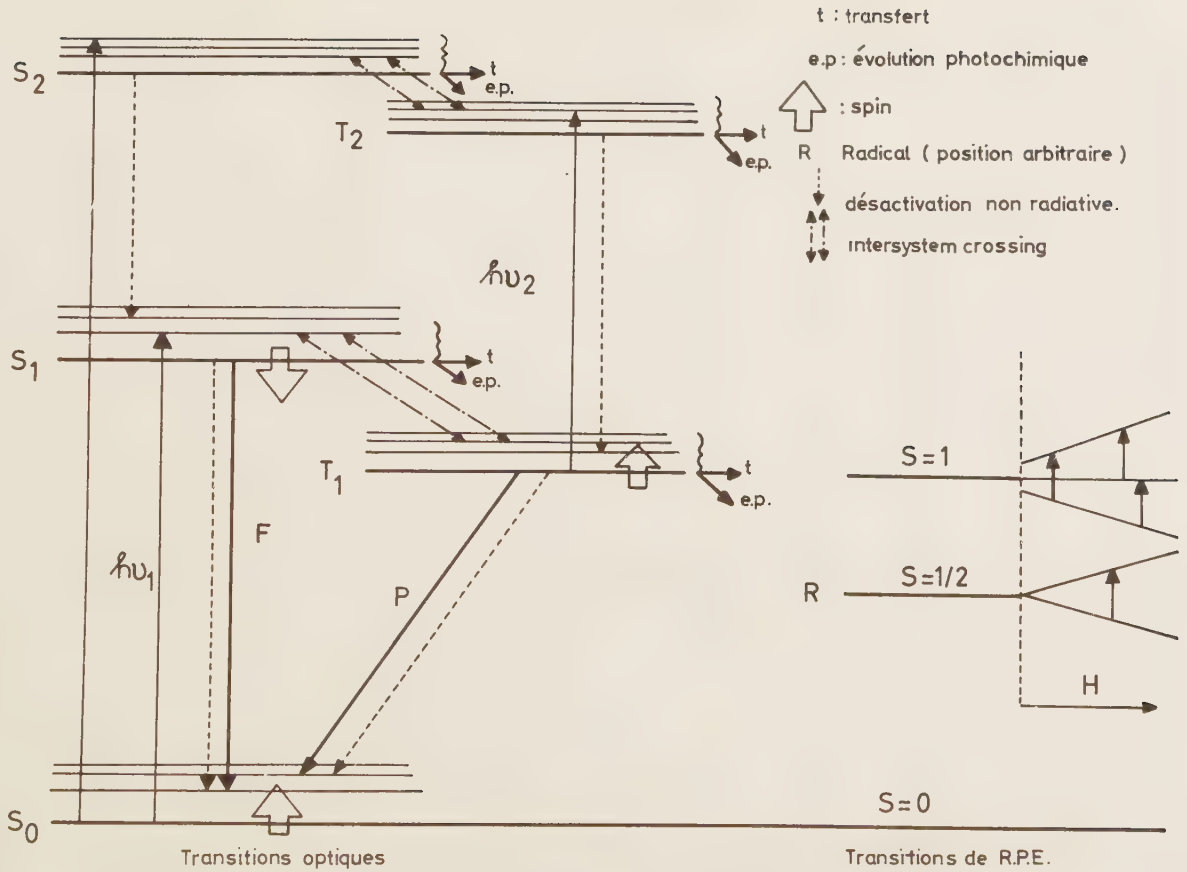


Fig. 1 Représentation simplifiée des transitions optiques & hertziennes pour une molécule.

CHAPITRE I

ETUDE THEORIQUE DE LA SPECTROSCOPIE ET DE LA PHOTOCHIMIE DES MOLECULES POLYATOMIQUES

Les trois acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine, trytophane et les combinaisons dans lesquelles nous les étudierons : peptides, protéines, présentent une courbe d'absorption caractéristique dans l'ultra-violet qui débute vers 310-320 mμ.

Nous appliquerons donc les principes généraux de la spectroscopie ultraviolette pour caractériser les états électroniques de la molécule excitée et les transitions entre ces états. En ce qui concerne la photochimie, nous rappelerons que dans ce domaine, les composés étudiés n'ont pas pour fonction principale de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique, contrairement à ce qui se passe par exemple, pour les composés impliqués dans un phénomène de photo-synthèse. L'absorption d'énergie prendra dans notre cas les caractères d'une agression pouvant conduire à l'inactivation biologique. Il n'y a pas de lien apparent entre les états excités électroniques atteints de cette façon et les mécanismes réactionnels normaux intervenant dans l'obscurité cellulaire. Pour rendre plus compréhensible l'exposé des résultats nous allons d'abord faire une brève mise au point sur les principes fondamentaux de la spectroscopie et de la photochimie des molécules organiques.

I. 1- ABSORPTION DES RADIATIONS LUMINEUSES PAR UNE MOLECULE ISOLEE

A/ ORBITALES MOLECULAIRES. NIVEAUX D'ENERGIE

Nous rappelerons qu'une première description des propriétés électroniques de la molécule se fait à l'aide des orbitales moléculaires. On distingue différents types d'orbitales :

orbitale σ
orbitale π Ce sont des orbitales liantes qui correspondent respectivement à la liaison simple et à la liaison double de la théorie de la valence. Chacune d'elle peut avoir un caractère non liant désigné par σ* et π*.

Orbitale n : Ce sont des orbitales non liantes, plus spécifiquement associées à des atomes possédant des doublets d'électrons libres : O, N, S. L'existence de tels doublets libres est une des caractéristiques fondamentales des molécules biologiques.

L'excitation d'une molécule se traduit par le passage d'un électron d'une orbitale, à laquelle correspond une énergie bien déterminée, sur une autre orbitale d'énergie plus élevée. A l'état fondamental, la population des différentes orbitales est déterminée par le principe d'exclusion de PAULI et le principe d'AUFBAU complétés par la règle plus générale de HUND. On peut les résumer ainsi : il ne peut y avoir plus de 2 électrons par orbitale et dans ce cas leurs spins sont opposés ; les orbitales sont occupées dans le sens des énergies croissantes.

Quand les électrons ont le choix entre plusieurs orbitales de même énergie et ne peuvent les occuper toutes doublement, l'état de plus basse énergie est obtenu en disposant les électrons de façon à ce qu'ils occupent le maximum d'orbitales possibles et que leurs spins dans ces orbitales soient les mêmes.

On rendra compte des promotions orbitales à l'aide de notations du type suivant :

$$\sigma^* \longleftarrow \sigma \qquad \sigma^* \longleftarrow n$$
$$\pi^* \longleftarrow \pi \qquad \pi^* \longleftarrow n$$

ou mieux pour une transition du type $\pi^* \longleftarrow n$, par exemple par

$$\sigma^2\pi^2 n\,\pi^* \longleftarrow \sigma^2\pi^2 n^2$$

ou encore en choisissant les axes :

$$\sigma^2\pi_x^2\rho_x\,\pi_x^* \longleftarrow \sigma^2\pi_x^2\rho_x^2$$

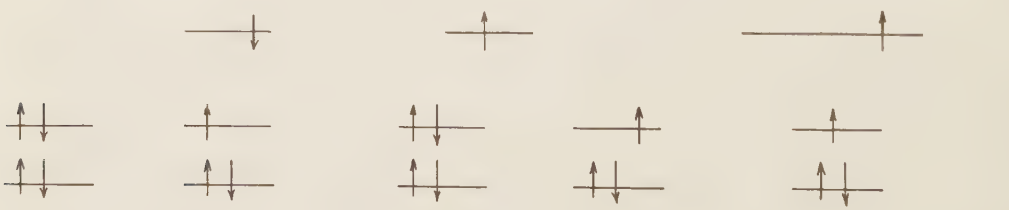
On rend compte de cette façon des configurations électroniques.

B/ ETATS ELECTRONIQUES

Une description encore plus précise de la transition électronique fait intervenir la multiplicité et la symétrie de chaque état électronique.

a) Multiplicité

Elle traduit la façon dont sont appariés les spins électroniques. Elle est égale à (2 S + 1), S étant le nombre quantique de spins.



S = O Etat singulet | $S = \frac{1}{2}$ Etat doublet | S = 1 Etat triplet

Paramagnétiques

Pour $S = \frac{3}{2}$ on a l'état quartet, S = 2 le quintet, etc...

La règle de HUND nous précise que l'état dont le nombre de spin est le plus grand a la plus basse énergie. L'état triplet se trouvera donc toujours en dessous de l'état singulet.

b) Symétrie

On peut effectuer sur la fonction d'onde un certain nombre d'opérations de symétrie :

- rotation autour d'un axe de symétrie
- inversion par un centre de symétrie
- réflexion sur un plan de symétrie
- rotation autour d'un axe, suivie d'une réflexion sur un plan ⊥ à l'axe.
- identité.

Le traitement complet de ce problème se fait à l'aide de la théorie des groupes. On construit des représentations matricielles des groupes d'opérations à réaliser. Lorsqu'on arrive à des représentations irréductibles on utilise la nomenclature suivante :

A. Représentations qui sont symétriques par rotation autour de l'axe principal.

B. Représentations qui sont antisymétriques par rotation autour de l'axe principal.

L'indice g indique que la représentation est symétrique par rapport à un centre d'inversion et l'indice u qu'elle est antisymétrique.

C/ REMARQUE SUR LES NOTATIONS

Lorsqu'il est nécessaire de caractériser les états électroniques on utilise très souvent les notations simplifiées suivantes : S_o, S_1, S_2... etc... pour les états singulets T_1, T_2, T_3 pour les triplets (8). Il existe des notations plus précises, mais il n'y a pas de représentation unique, il conviendra donc de préciser à chaque fois le système utilisé. La seule règle générale est d'écrire d'abord l'état excité. A titre d'exemple, voici les différentes notations possibles pour désigner une transition $\pi^* \leftarrow n$ de la formaldéhyde.

$\lambda_{max} = 2700\ \mathring{A}$	Position du maximum
$\varepsilon_{max} = 100$	Coefficient d'extinction moléculaire
$^1A_2 \leftarrow {}^1A_1$	Théorie des groupes
$Q \leftarrow N$	Notation de MULLIKEN
$^1_u \leftarrow {}^1A$	Notation de PLATT
$\sigma^2 \pi_x^2 \rho_z \pi_z \leftarrow \sigma^2 \pi_x^2 \rho_z^2$	Orbitale moléculaire
$\pi \leftarrow n$	Notation de KASHA

D/ SPECTRES D'ABSORPTION

La position, l'intensité et la polarisation des spectres d'absorption sont déterminées par les règles suivantes :

1) Le principe de FRANCK et CONDON

Dans sa forme la plus simple il stipule, qu'étant donné la masse élevée des noyaux comparativement aux électrons, une transition électronique se produit si rapidement (10^{-15}s) que les noyaux restent pratiquement immobiles; ceci se traduit sur les schémas représentatifs du type de Morse par des transitions verticales (fig. 2).

2) Les règles de sélection

La probabilité d'une transition peut être évaluée de plusieurs façons. La théorie classique de la dispersion conduit à l'expression donnant le nombre f :

$f = 4,32 \times 10^{-9} \int_0^\infty \varepsilon \, d\nu$ où ε est le coefficient d'extinction moléculaire.

La mécanique quantique donne la relation :

la probabilité de transition $P \simeq \left| \int_{-\infty}^{\infty} \psi_n M \psi_m \, d\tau \right|^2$ où ψ_n et ψ_m sont les fonctions d'onde des états électroniques et M le moment de transition dipolaire. Les transitions sont soumises à des règles de sélections quantiques qui font intervenir :

a) la multiplicité : pour qu'une transition soit permise il faut qu'il n'y ait pas de changement de multiplicité.

On peut, en fait, observer des transitions théoriquement interdites par exemple les transitions singulet ⟶ triplet à cause des couplages résiduels et des pertubations introduites par l'environnement : couplages quadripolaires et surtout couplages spin-orbite, pertubations introduites par des ions ou des molécules paramagnétiques.

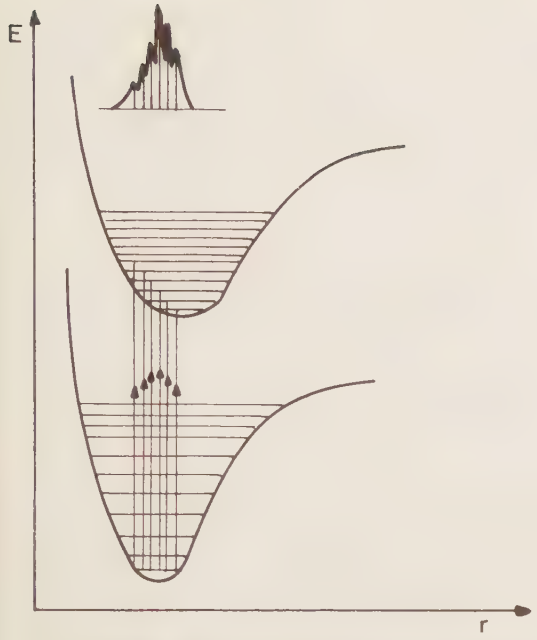
b) la symétrie : La fonction ψ_n M ψ_m ne doit pas être nulle pour que la transition soit permise. Comme ψ_n est symétrique il faut que $M\psi_m$ m soit également symétrique. Ceci correspond à la polarisation de la transition. Comme précédemment il existe de nombreuses exceptions dues au fait que la pureté de la symétrie des différents états électroniques est modifiée par les mouvements vibrationnels ayant des symétries différentes (états vibroniques). L'exemple le plus classique est celui de la bande d'absorption ($\lambda_{max} = 2640$ Å) du benzène.

E/ REPRESENTATIONS GRAPHIQUES (Figure 2)

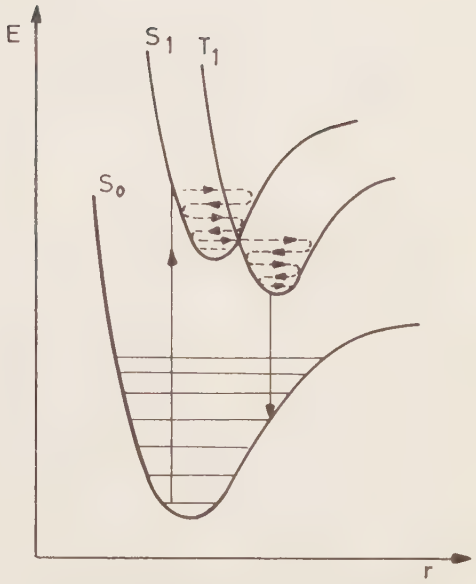
Pour des raisons de commodité, on trace pour les molécules polyatomiques des diagrammes analogues à ceux de MORSE, qui représentent pour les molécules diatomiques les courbes d'énergie potentielle en fonction de la distance des noyaux. C'est évidemment une très grossière approximation puisqu'il faudrait tracer des surfaces équipotentielles dans un diagramme à plusieurs dimensions. Dans cette représentation approximative on porte en abscisse une coordonnée de configuration, par exemple la distance entre deux groupements fonctionnels, ou l'angle de deux cycles (6).

I. 2- LES ETATS EXCITES

Nous avons vu que la molécule à l'état excité peut exister sous deux formes: l'état singulet et l'état triplet. Ces deux états ont une structure électronique et des caractéristiques entièrement différentes de celles de l'état singulet fondamental.



Probabilité des transitions entre deux états électroniques



Représentation des états excités singulet & triplet

Principe de FRANCK & CONDON

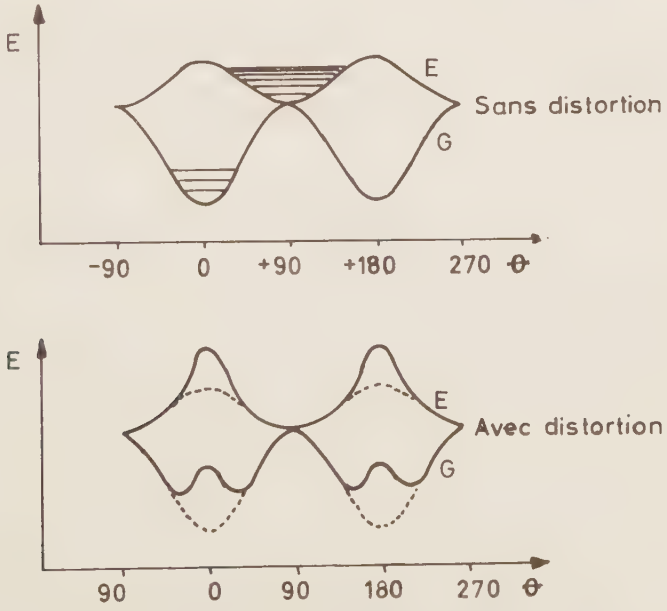


Fig. 2 Courbe d'énergie potentielle de l'éthylène en fonction de l'angle de rotation.

A/ DUREE DE VIE

La durée de vie de l'état singulet est toujours très courte, de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-3} s. Sa désactivation est facilitée par le fait que le retour se fait vers un état de même multiplicité. Au contraire la durée de l'état triplet est beaucoup plus longue et peut atteindre plusieurs secondes : la transition vers l'état fondamental étant, en principe interdite par le changement de multiplicité.

B/ CONFIGURATION

L'excitation qui correspond au passage d'un électron d'une orbitale non liante sur une orbitale anti-liante s'accompagne toujours de modifications dans la configuration rotationnelle et vibrationnelle de la molécule. Il y a en fait un remodelage complet de la molécule qui se traduit sur les schémas de MORSE par une nouvelle courbe d'équilibre caractéristique de l'état excité. Une question particulièrement importante est de connaitre l'incidence d'une telle modification de structure sur l'environnement. Dans le cas d'une molécule en solution rigide, il est nécessaire d'envisager un réarrangement local momentané des molécules de la matrice de solvant pour obtenir un nouvel état d'équilibre qui peut durer plusieurs secondes (triplet). Les interactions de la molécule excitée avec le milieu déterminent un phénomène de relaxation analogue à la relaxation spin-réseau bien connue pour les radicaux libres. Ce phénomène fondamental, qui conditionne tous les processus de désactivation dont nous parlerons prochainement, n'a pas fait jusqu'ici l'objet d'études approfondies, en particulier dans le cas des solutions rigides et des cristaux mixtes.

C/ PROPRIETES CHIMIQUES

La réactivité chimique est déterminée par la structure électronique de la molécule. Elle sera notablement augmentée lorsqu'on passe à l'état excité, en particulier à l'état triplet pour lequel on a deux électrons à spins parallèles, donc à couplage fortement répulsif. La durée de vie relativement longue de cet état étant un facteur également favorable à la réaction.

I. 3- ETUDE DE LA DESACTIVATION

Nous avons vu que la durée de vue des états excités est brève c'est-à-dire que la molécule n'est pas stable lorsqu'elle a absorbé un photon (l'état triplet pouvant être considéré seulement comme métastable). Elle va transformer ou réémettre l'énergie absorbée par l'un des nombreux processus que nous allons examiner. Les facteurs principaux intervenant dans la désactivation étant :

- le niveau d'énergie atteint
- la structure de la molécule à l'état excité
- la nature de l'environnement

A/ CONVERSION INTERNE ET "INTERSYSTEM-CROSSING"

1 - Conversion interne

Il s'agit de la transformation d'une partie ou de la totalité de l'énergie électronique emmagasinée, en énergie vibrationnelle qui est alors transférée sur le milieu extérieur. C'est une désactivation non radiative.

La vitesse très élevée de ce processus : 10^{-13}s. le rend compétitif avec tout autre processus intramoléculaire en particulier avec le changement de multiplicité. Cette désactivation peut être partielle ou totale mais elle ne supprime jamais complètement la luminescence. La conversion interne dépend essentiellement de la géométrie et de la flexitibilité de la molécule et de l'aptitude du milieu extérieur à accepter l'énergie d'origine vibrationnelle.

2 - "Intersystem-crossing"

Ce vocable désigne la transition singulet ⟶ triplet entre états excités. Il s'accompagne toujours d'une conversion interne partielle. Ce changement de multiplicité ou "spin-flip" est un processus rapide : 10^{-7} seconde. Il est caractérisé par le rapport

$$Q = \frac{P}{F} = \frac{\text{intensité de phosphorescence}}{\text{intensité de fluorescence}}$$

B/ DESACTIVATION RADIATIVE : EMISSION DE LUMINESCENCE

Après une conversion interne partielle, la molécule émit un photon qui correspond pour la transition.

$S_2^* \rightarrow S_1$ à la fluorescence

$T_1^* \rightarrow S_1$ à la phosphorescence.

Le spectre de fluorescence présente dans les cas simples une certaine symétrie avec le spectre d'absorption.

C/ TRANSFERT DE L'ENERGIE

Si un certain nombre de conditions favorables sont remplies, la molécule peut se désactiver en transférant son énergie d'excitation à une autre molécule qui accomplit de ce fait une transition électronique. Pour des molécules simples en solution les cas les plus courants de transfert sont :

Transfert singulet → singulet
Transfert triplet → triplet

On a pu mettre en évidence récemment des transferts avec changement de multiplicité.

L'étude théorique d'un mécanisme de transfert a été développée par FÖERSTER (9). Les conditions à remplir pour obtenir un tel transfert par induction de résonance sont encore mal connues ; on peut néanmoins insister sur les faits suivants :

a) facteurs stériques

Situées à une distance maximum voisine de 60 Å, les molécules D (donneur) et A (accepteur) devront avoir une disposition permettant le couplage dipôle-dipôle. Il n'est cependant pas nécessaire de faire intervenir la formation d'un complexe stable au sens habituel du terme (distances intermoléculaires de l'ordre des dimensions moléculaires, liaison par forces secondaires).

b) facteurs énergétiques

Pour que le transfert soit possible, il faut que le niveau énergétique du donneur soit supérieur ou très voisin de celui de l'accepteur. La différence d'énergie est en général de l'ordre de quelques kilo-calories par mole

$$E_{kcal/mole} = \frac{2,84.10^5}{\lambda_{\mathring{A}}} = 2,84.10^{-3}\ \bar{\nu}\ \ (cm^{-1})$$

Dans le cas des associations moléculaires, pour un nombre de motifs égal ou supérieur à trois on utilise le modèle de l'exciton qui peut être défini comme étant la représentation des interactions de résonance entre les états excités d'association à faible constante de couplage. Les différents aspects de la théorie dépendent de la nature atomique ou moléculaire des unités constituantes, de la nature de l'environnement, de la force des interactions moléculaires, de la structure de l'agrégat, de la nature des états excités mis en jeu. Après avoir donné une description correcte de l'état excité de cette association on donne le mécanisme de la migration de l'énergie.

Cas de l'annihilation de triplets (Figure 3)

L'interaction de deux molécules qui se trouvent dans l'état triplet, peut conduire à un phénomène d'annihilation. L'une des molécules transfère son énergie sur l'autre qui se trouve portée dans un état d'excitation d'énergie 2T.

Ce nouvel état excité peut être un état singulet S_2 ou un état triplet T_2. En règle générale par une conversion interne très rapide, la molécule revient sur le premier état excité S_1 ou T_1. Ce phénomène d'annihilation peut se produire pour des molécules en solution très concentrée, mais il est plus spécifique de l'état condensé (cristal moléculaire où les intéractions triplet-triplet sont élevées).

D/ REMARQUE

Il convient de mentionner la possibilité d'obtenir une multiplication d'énergie par un autre phénomène : celui de l'absorption biphotonique. La molécule portée dans un état excité de durée de vie suffisamment longue (triplet) absorbe un nouveau photon et se trouve donc portée au niveau T_2.

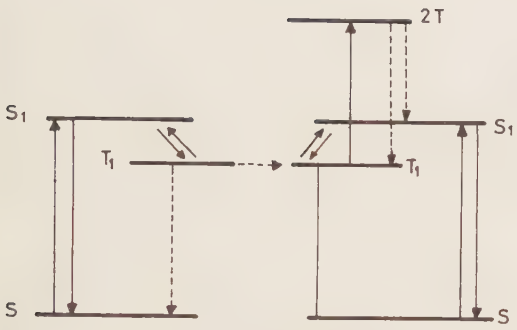
Nous reviendrons plus longuement sur ce phénomène au cours de l'étude de la photolyse des acides aminés aromatiques.

E/ CONVERSION PHOTOCHIMIQUE DE LA MOLECULE

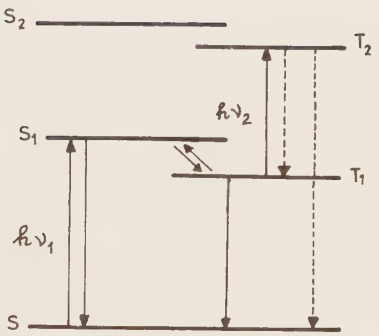
Il s'agit des phénomènes réversibles ou non, conduisant à de nouvelles espèces moléculaires. Ces nouvelles espèces pouvant provenir d'une dissociation ou simplement d'un réarrangement.

1) Prédissociation (Figure 3)

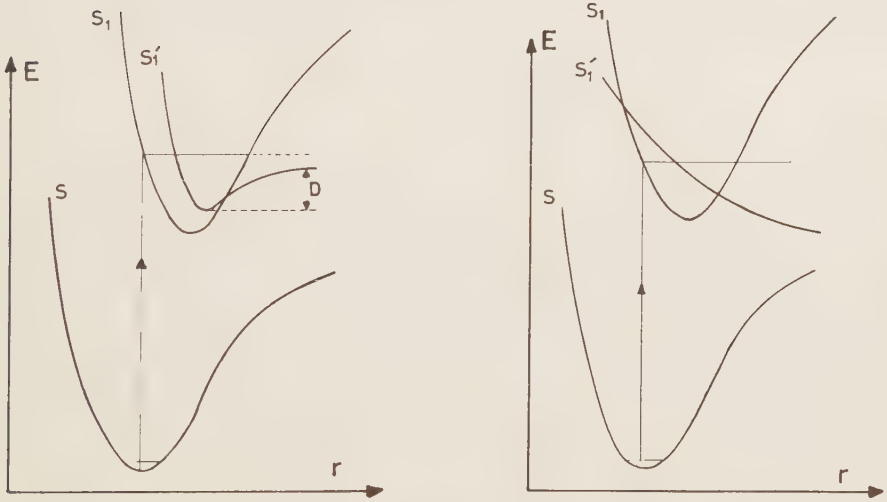
Ce terme a son origine dans le phénomène de disparition de la structure rotationnelle des spectres d'absorption de certaines molécules à l'état gazeux. Il désigne en fait une véritable dissociation des molécules complexes ; dissociation qui s'interprète par l'existence de plusieurs états très voisins dont l'un conduit à la dissociation. Cette dissociation influe sur les propriétés émissives de la molécule pouvant dans certains cas supprimer totalement la fluorescence.



Annihilation de triplets



Absorption biphotonique



Prédissociation

Fig. 3

2) Photo-éjection d'électrons

Le résultat d'un tel processus peut s'écrire :

$$A + h\nu \xrightarrow[\text{possibles}]{\text{divers mécanismes}} A^+ + \bar{e}$$

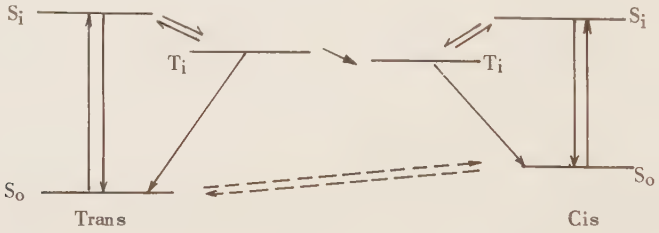
Dans le domaine du visible et de l'ultra-violet, l'étude expérimentale du phénomène est peu avancée. Pour expliquer les différences entre l'énergie absorbée conduisant à la photo-éjection et de l'énergie d'ionisation calculée par voie théorique, on fait appel à des mécanismes complexes en particulier une absorption biphotonique rendue possible par un état intermédiaire de durée de vie suffisante : complexe à transfert de charge ou triplet. La recombinaison de l'électron et de l'ion peut donner lieu à différents types d'émission (fluorescence retardée). Comme nous le verrons, un certain nombre de résultats expérimentaux obtenus sur nos acides aminés aromatiques sont en faveur de l'existence d'un tel phénomène de photo-éjection.

3) Autres modifications photo-chimiques

D'un point de vue général nous rappelerons quelques-uns des autres mécanismes possibles :

a) L'isomérisation cis-trans. C'est le cas pour des molécules comportant une liaison éthylènique.

On a pu démontrer l'intervention de l'état triplet dans certains cas pour lesquels on aurait le schéma énergétique suivant.



b) L'isomérisation de valence : qui correspond à la rupture d'une liaison, à l'ouverture ou à la fermeture d'un cycle. Un exemple particulièrement spectaculaire est donné par des molécules photochromiques : les spiropyranes.

c) Un réarrangement du squelette : c'est-à-dire une nouvelle distribution des atomes ou des groupements chimiques de la molécule.

F/ FORMATION DE DIMERES

Il s'agit d'une réaction photochimique particulière conduisant à une association qui peut être stable ou au contraire n'être qu'un état transitoire. Il faudra donc distinguer :

a) les excimères. Il s'agit de l'association momentanée d'une molécule excitée et d'une molécule à l'état fondamental. La formation de ce complexe transitoire se traduit en général par un quenching important de la fluorescence et l'apparition d'une nouvelle émission, souvent faible, vers les grandes longueurs d'onde.

b) les dimères : Qui sont des associations plus stables, peuvent redonner d'ailleurs les monomères à la suite d'une irradiation dans la nouvelle bande d'absorption.

I. 4- CONCLUSION

L'exposé extrêmement simplifié qui vient d'être fait nous servira de base pour la présentation et la compréhension de notre étude expérimentale. Cette étude est centrée sur l'état triplet responsable de la phosphorescence des trois acides aminés aromatiques. Elle comprendra :

1) Une étude des spectres d'émission et des durées de vie de la phosphorescence à l'aide d'un spectrophosphorimètre.

2) La détection et l'étude de la résonance paramagnétique des états triplets

3) La détection et l'étude par R. P. E. des phénomènes photochimiques consécutifs à l'irradiation ultra-violette.

Pour l'étude magnétique des états triplets nous présenterons les résultats obtenus sur les carbures dont sont dérivés les acides aminés aromatiques. D'un autre côté, nous n'avons pas manqué de nous intéresser à des combinaisons telles di-peptides, polypeptides, protéines, lorsque les résultats obtenus sur le monomère pouvaient avoir une application directe.

I. 5- CAS DES BIOPOLYMERES - THEORIE DE L'EXCITON

Nous savons qu'en fait les systèmes réagissant à l'échelon biologique sont le plus souvent des macromolécules. La plupart des protéines contiennent, en proportion assez faible d'ailleurs, les acides aminés aromatiques que nous allons étudier. Il est donc essentiel de saisir les phénomènes coopératifs qui découlent de l'association des monomères. La constitution des protéines étant des plus complexes, on utilise avec profit les modèles plus simples constitués par les polypeptides. La propriété fondamentale de ces polymères est de pouvoir donner dans un milieu convenable une structure parfaitement organisée de type hélicoïdal, analogue à celle des polynucléotides et qui n'a guère d'équivalent pour les polymères artificiels.

On obtient une organisation qui est en fait voisine du "cristal linéaire", et pour laquelle le phénomène le plus intéressant est le transfert d'énergie actuellement décrit à l'aide de la théorie de l'exciton.

Le modèle de l'exciton moléculaire peut être défini comme la représentation des interactions de résonance entre les états excités de systèmes faiblement couplés. La forme de la théorie dépend de la constitution de l'édifice moléculaire, des actions extérieures et des états excités "collectifs" et du mode de migration de l'énergie.

Les interactions tendent à séparer les niveaux d'énergie multiples d'un système non pertubé. Il en résulte un élargissement général des spectres et une diminution de l'énergie des transitions électroniques entre de tels groupes d'états. Les états excités sont représentés par des "bandes excitoniques" d'énergie. Les transitions vers cette bande sont régies par des règles de sélection récemment précisées par KASHA (10).

Nous verrons que dans le cas des polypeptides, les courbes d'absorption laissent seulement présumer l'existence de telles bandes excitoniques. Ces courbes d'émissions sont nettement en faveur d'états excités associés sous forme d'excimères.

*

CHAPITRE II

RAPPELS SUR LA THEORIE DE R. P. E. METHODES EXPERIMENTALES

1ère Partie : RAPPELS SUR LA THEORIE DE LA R. P. E.

II. 1- LE PARAMAGNETISME

Au moment cinétique total $\vec{P} = \vec{J}\,\hbar$ d'un édifice électronique où $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$, on peut associer un moment magnétique colinéaire avec $\vec{J}$ tel que $\vec{M} = \gamma \vec{J}\,\hbar$, γ étant le rapport gyromagnétique. En appliquant le théorème du moment cinétique, on trouve que le mouvement de $\vec{M}$ dans un champ magnétique statique est régi par l'équation :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \wedge \vec{H}_o$$

$\vec{M}$ est animé d'un mouvement de précession autour de $\vec{H}_o$ de vitesse angulaire $\omega_o = \gamma H_o$ (précession de LARMOR).

A/ LE PARAMAGNETISME STATIQUE

C'est une propriété macroscopique qui s'exprime, pour un volume de matière égale à l'unité, plongé dans un champ magnétique, par le vecteur intensité d'aimantation $\vec{I} = \Sigma \vec{M}_i$ $\vec{I} = \chi_o \vec{H}_o$ χ_o étant la susceptibilité statique.

La probabilité pour un dipôle de posséder l'énergie $E_i = -\vec{M}_i \times \vec{H}_o$ est selon la loi de BOLTZMANN.

$$P_i = e^{-\frac{E_i}{kT}} \quad \text{(à une constante près)}$$

Sachant que $E_i = g\,\beta H_o\, m_i$ où m = est le nombre quantique magnétique
g = le facteur de fission spectroscopique
β = le magnéton de BOHR $= |e|\frac{\hbar}{2mc}$

on peut exprimer le moment magnétique par unité volume (H_o étant orienté suivant oz).

$$M_z = N g\, J\, \beta\, B_j(x)$$

où N est le nombre de centres paramagnétiques et $B_J(x)$ une fonction de BRILLOUIN de $x = \frac{g\ J\ \beta\ H_o}{k\ T}$

Pour $x \ll 1$ on obtient $\chi_o = -\frac{N g^2\ \beta^2\ J\ (J+1)}{3\ k\ T}$

B/ ORIGINE DU PARAMAGNETISME ELECTRONIQUE

Il faut avoir un moment angulaire résultant non nul. Ce sera le cas pour

a) les ions des éléments de transition et les terres rares
b) les radicaux libres
c) les états triplets
d) les complexes à transfert de charge
e) les défauts des réseaux dans les solides
f) les électrons de conduction.

C/ RESONANCE ELECTRONIQUE

L'application d'un champ magnétique conduit à une décomposition des niveaux d'énergie de l'état paramagnétique considéré. Chaque niveau J est décomposé en (2J + 1) sous-niveaux auxquels correspondent les nombres quantiques magnétiques $-J \leqslant M \leqslant J$. Les règles de sélection de RABINOWITCH disent que des transitions entre ces sous-niveaux sont possibles si $\Delta M = \pm 1$ ou 0. La résonance consiste à induire une transition entre ces sous-niveaux à l'aide d'une onde électromagnétique (transition dipolaire magnétique).

Etant donné le faible écart énergétique produit par les champs réalisables aux laboratoires et la faible différence existant entre des populations de ces sous-niveaux (loi de BOLTZMANN) on utilise une onde du domaine hertzien et l'absorption à la résonance en sera difficile à détecter.

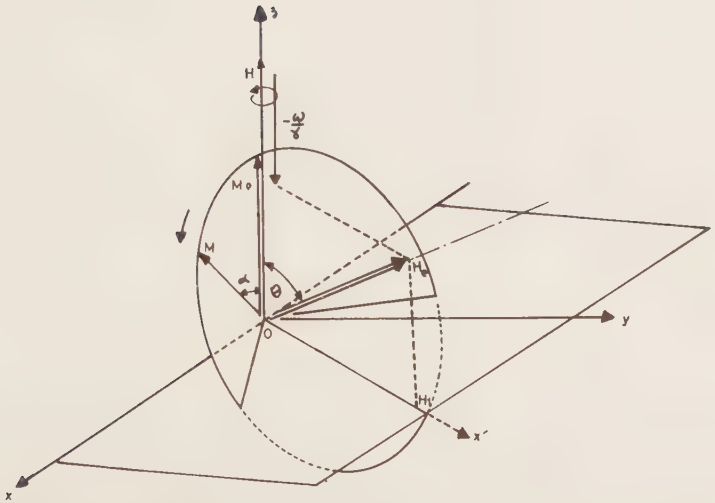
II. 2- LE PHENOMENE DE RESONANCE ELECTRONIQUE

A/ DESCRIPTION (Figure 4)

La mécanique classique permet de donner une description simplifiée mais très accessible du phénomène. On choisit pour cela un état $S = \frac{1}{2}$ c'est le cas de l'électron célibataire. Il s'agit de décrire le mouvement de $\vec{M}$ lorsqu'on superpose à $\vec{H}_o$, un champ tournant perpendiculaire $\vec{H}_1$ (qui est en fait l'une des composantes circulaires du champ magnétique alternatif d'une onde plane polarisée). Dans un système d'axes tournant autour de $\vec{H}_o$ tout se passe comme si on avait un champ effectif $\vec{H}_e = \vec{H}_o - \frac{\vec{\omega}}{\gamma}$ autour duquel précessionne $\vec{M}$. A la résonance pour $\omega = \gamma H_o$ $\vec{H}_e = \vec{H}_1$ et $\vec{M}$ oscille entre deux positions opposées.

Dans ces conditions l'orientation moyenne de $\vec{M}$ par rapport à $\vec{H}_o$ est modifiée et s'écarte notablement de la valeur initiale qui est petite puisque $H_1 \ll H_o$.

Pour rendre compte plus complètement du phénomène (absorption d'énergie, saturation) il faut :



Mouvement de $\vec{M}$ d'après PAKE (Paramagnetic Resonance p.17 Benjamin, Inc 1962)

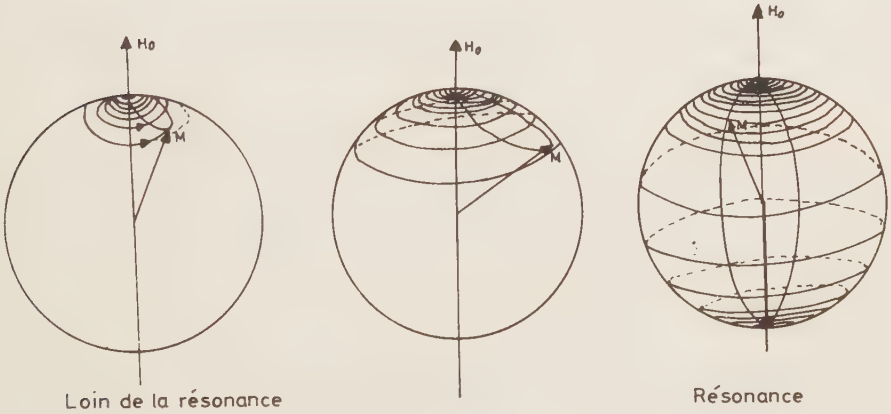


Fig. 4

1°) Définir les temps de relaxation

- temps de relaxation spin-réseau T_1 qui caractérise le temps d'établissement du nouvel équilibre lorsqu'on applique brusquement un champ H_0.

- temps de relaxation spin-spin T_2 qui caractérise le temps d'établissement du nouvel équilibre lorsqu'à partir de l'état précédent on applique brusquement un champ hyperfréquence H_1.

2°) Résoudre les questions de BLOCH qui sont les équations du mouvement $\mathcal{M}$, moment macroscopique résultant = $\Sigma \vec{M}_i$.

$$\frac{d\vec{\mathcal{M}}x}{dt} = \gamma (\vec{H}_0 \wedge \vec{\mathcal{M}}) x - \frac{\vec{\mathcal{M}}x}{T_2} \qquad \frac{d\vec{\mathcal{M}}y}{dt} = \gamma (\vec{H}_0 \wedge \vec{\mathcal{M}}) y - \frac{\vec{\mathcal{M}}y}{T_2} \qquad \frac{d\vec{\mathcal{M}}z}{dt} = \gamma (\vec{H}_0 \wedge \vec{\mathcal{M}}) z - \frac{\vec{\mathcal{M}}z - \vec{\mathcal{M}}_0}{T_1}$$

La résolution de ces équations permet d'obtenir l'expression de la susceptibilité complexe : $\chi = \chi' - i\chi''$

puisqu'on a $\chi' = \frac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \dfrac{T_2 (\omega_0 - \omega)}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2}$ dispersion

$$\chi'' = \tfrac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \frac{1}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2}$$ absorption

Ces équations rendent bien compte du phénomène en particulier lorsque $\gamma^2 H_1^2 T_1 T_2$ est petit. La variation de χ'' est représentée par une courbe de LORENTZ dont la largeur à mi-hauteur est $\Delta\omega = \dfrac{1}{T_2}$. On peut également rendre compte de la saturation lorsque $\gamma^2 H_1^2 T_1 T_2$ n'est plus $\ll 1$. Pour $H_1 = (\gamma^2 T_1 T_2)^{-1/2}$, χ'' est divisé par deux. Il convient de préciser que le balayage de la raie sera "lent" c'est-à-dire que le temps de balayage $\gg T_1 \gg T_2$.

B/ FORME ET STRUCTURE DE LA RAIE DE RESONANCE

Les paramètres qui définissent un spectre de résonance paramagnétique électronique sont :

1°) la valeur de g : étant donné la contribution du moment orbital, g peut varier de 1 à 6, pour les atomes paramagnétiques. Dans les autres cas sa valeur est très voisine du g de l'électron : g = 2,0023.

2°) la structure : structure fine ou hyperfine caractérisée par des coefficients de couplage.

3°) la largeur de la raie.

Ces paramètres dépendent essentiellement des interactions entre les spins (spins électroniques et spins nucléaires). Ces problèmes d'interaction peuvent être traités d'une façon très générale à l'aide de l'Hamiltonien d'ABRAGAM et PRYCE. Dans la pratique on écrit un Hamiltonien effectif où n'interviennent que les interactions de spins justifiées si possible par des arguments physiques simples, c'est l'Hamiltonien de spin. Dans le cas des radicaux libres où le facteur g est toujours très voisin de 2,0 et pour lesquels les interactions électrons-noyaux sont les plus importantes puisqu'elles donnent la structure hyperfine, on peut écrire :

$$\mathcal{H} = g_e g_i \beta_e \beta_i \left[\frac{S_e - S_i}{(r_e - r_i)^3} - 3 \frac{(S_e r)(S_i r)}{(r_e - r_i)^5} - \frac{8\pi}{3} S_e S_i \delta (r_e - r_i) \ldots \right]$$

où g_e = g de l'électron — S_e = opérateur de spin de l'électron

g_i = g du noyau — S_i = opérateur de spin du noyau

β_e = magnéton de BOHR de l'électron — r_e = position de l'électron

β_i = magnéton de BOHR du noyau — r_i = position du noyau

$\delta (r_e - r_i)$ = fonction de DIRAC

On peut diviser cet Hamiltonien en deux parties qui correspondent :

1) aux interactions dipolaires essentiellement anisotropes

2) aux interactions de contact

Pour rendre compte des résultats expérimentaux, il convient de faire intervenir :

a) les interactions de configuration qui rendent compte de l'existence de "densité de spins" au niveau des protons du radical en admettant une combinaison partielle des orbitales σ et π . Cette interaction est caractérisée par la valeur de ΔH (distance entre les deux raies de résonance) qui est de 28 gauss pour les carbures aromatiques.

b) l'Hyperconjugaison : qui rend compte des interactions avec les groupements latéraux d'un cycle, par exemple le CH_3 du toluène.

Les deux interactions de contact conduisent donc à l'apparition d'une structure hyperfine, la position et la forme des raies pouvant être modifiées par les interactions de type dipolaire.

La largeur des raies de résonance sera déterminée par :

1) Les interactions dipolaires spin-spin. VAN VLECK puis PRYCE et STEVENS ont traité ce problème. Les interactions de ce type conduisent à un élargissement de la raie qui devient approximativement gaussienne.

2) Les interactions spin-réseau

3) Les interactions d'échange : qui conduisent à un rétrécissement de la raie de résonance. Elles correspondent à un échange rapide des électrons entre orbitales de différentes molécules, conséquence directe du principe d'incertitude.

La largeur de la raie peut être modifiée par le phénomène de saturation

Dans la bande de 3cm on utilise la relation

$$H_{\substack{max \\ gauss}} = \frac{1}{17,5} \sqrt{Q.\ P}$$

Q = facteur surtension de la cavité

P = puissance hyperfréquence

II. 3- ETUDE EXPERIMENTALE DE LA R. P. E.

1) Principe de la détection

Lorsqu'elle est placée dans le champ hyperfréquence la substance à étudier possède une susceptibilité complexe $\chi = \chi' - i\chi''$. Il s'agit de déterminer l'absorption d'énergie à la résonance, qui varie comme χ'' . Pour cela on place l'échantillon au niveau d'un noeud de champ magnétique de l'onde stationnaire qui s'établit dans une cavité résonante. On enregistrera la modification de l'onde lorsque la relation de résonance $h\nu = g\beta H$ est satisfaite. A l'heure actuelle, la majorité des spectromètres fonctionne par réflexion.

L'introduction d'une substance paramagnétique dans la cavité modifie le coefficient de surtension Q d'une quantité.

$\Delta Q = Q_o^2 \, 4\pi\chi'' \eta$, η étant le coefficient de remplissage.

On détecte la variation du coefficient de réflexion à l'aide d'un détecteur bolométrique ou d'un cristal redresseur.

Pour des raisons de commodité, on travaille à une fréquence fixe et on fait varier H de façon à "balayer" la raie de résonance.

Le montage expérimental sera donc réalisé de la façon suivante :

2) Principe du spectromètre (Figure 5)

L'appareil comprend trois parties :

a) partie magnétique

Il faut produire un champ suffisamment homogène au niveau de l'échantillon et suffisamment stable pour détecter des raies de quelques gauss de large. On réalise actuellement des électro-aimants répondant à ces conditions et produisant des champs qui peuvent atteindre quelques dizaines de milliers de Gauss. Voici les caractéristiques de l'électro-aimant VARIAN que nous avons utilisé.

Diamètre des pièces polaires : 15cm ; Entrefer : 7cm ; Volume de meilleure homogénéité : $10 cm^3$; Alimentation stabilisée (10^{-5} à 10^{-6}) à lampes fournissant un courant max. de 1,5 A. sous 1500 V. ; champ variable entre 0 et 4500 gauss.

Refroidissement par circulation d'eau.

Le balayage est réalisé au moyen d'un système potentiométrique entrainé par moteur synchrone, délivrant une tension continue qui est envoyée sur l'amplificateur de stabilisation de l'alimentation.

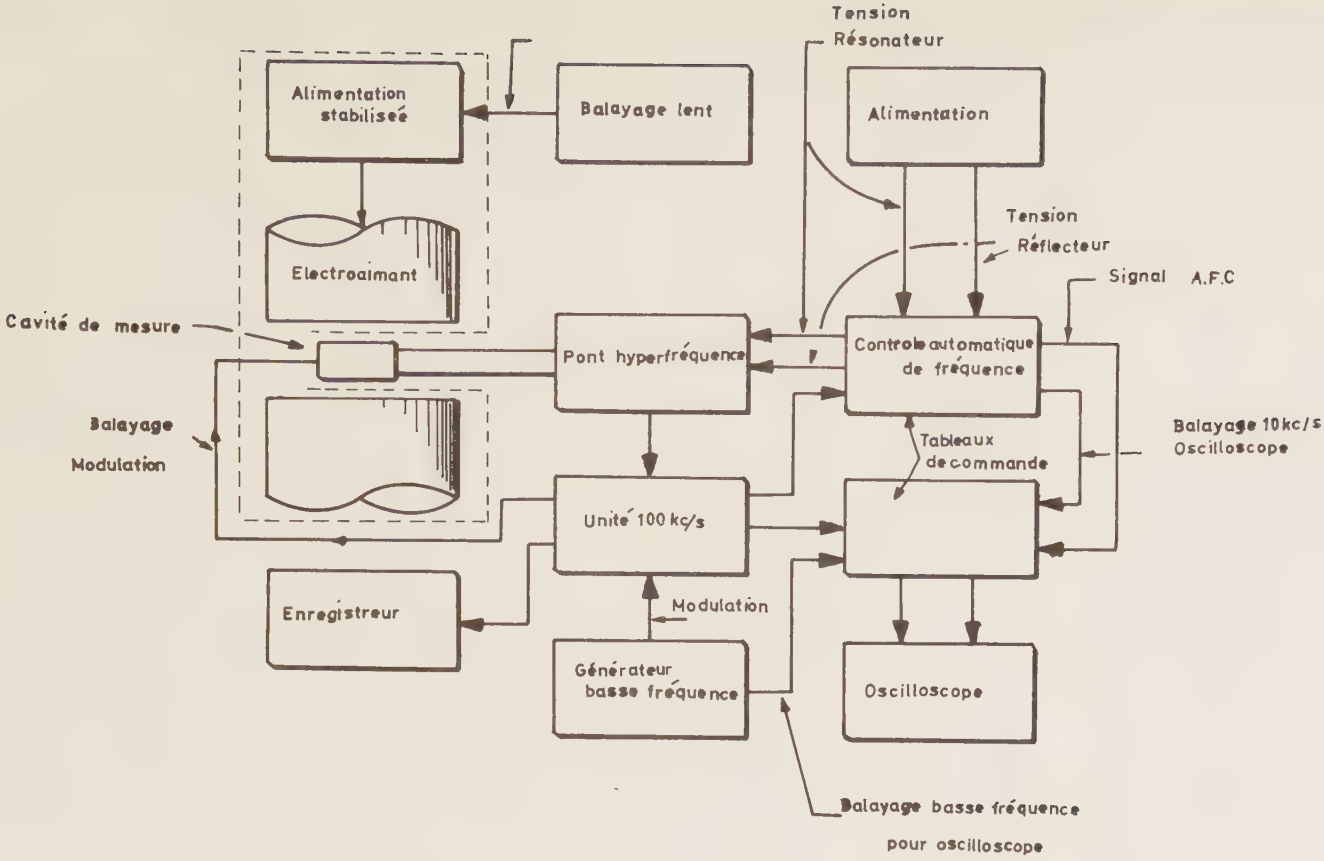


Fig. 5

Schéma de principe du spectromètre.

b) partie hyperfréquence

Elle comprend le générateur qui est un klystron réflexe, les guides, la cavité de mesure et le détecteur. Le klystron est stabilisé en fréquence à l'aide de système de contrôle automatique de fréquence (A F C) utilisant soit une cavité de référence dans un montage du type "POUND" soit la cavité de mesure. Ce dernier système a l'avantage d'avoir un fonctionnement relativement simple et d'adapter constamment la fréquence de générateur à la fréquence de résonance de la cavité de mesure. Il présente l'inconvénient de nécessiter une modulation du réflecteur qui peut être gênante dans l'étude des raies étroites. Voici quelques unes des caractéristiques de montage VARIAN que nous avons utilisé :

- klystron réflex, puissance 200 à 400 mw, thermostaté par bain d'huile, stabilisé en fréquence à l'aide d'un système A F C qui l'asservit à la cavité de mesure (lock-in) et qui utilise une fréquence de balayage de 10 kc/s.

- cavité rectangulaire du type TE_{012} équipé de fenêtres permettant l'irradiation et différents accessoires permettant le travail à température variable (de - 196°C à + 300°C), en solution aqueuse, par électrolyse, etc ...

- le détecteur est une diode au silicium à point d'or.

Un montage annexe permet de travailler en super-hétérodyne. On utilise pour cela un émetteur secondaire dont la fréquence est voisine de celle du klystron. On amplifie le battement de fréquence intermédiaire 30 Mc/s. Pour de faibles puissances (inférieures à 1 mW) ce montage est d'une sensibilité supérieure et il peut être employé quelque soit le temps de relaxation des centres paramagnétiques étudiés.

c) partie électronique

Il s'agit de détecter, d'amplifier et d'enregistrer le signal. En dehors du montage superhétérodyne, la méthode la plus classique consiste à utiliser une modulation du champ magnétique. L'amplification du signal est dans ces conditions beaucoup plus commode mais on obtient en fait la dérivée première de la raie de résonance. Dans le spectromètre VARIAN que nous avons utilisé, la fréquence de modulation est de 100 kc/s. Elle se fait grâce à de petites bobines appliquées contre les parois en céramique argentée de la cavité et qui permettent d'obtenir des champs allant jusqu'à 15 gauss. Le signal modulé est comparé à un signal de référence à 100 kc/s dans une détection de phase et le signal continu obtenu est amplifié et enregistré.

A l'heure actuelle le spectromètre 3cm, à modulation 100 kc/s. analogue à celui que nous avons utilisé représente certainement l'appareil dont les performances et la commodité d'emploi le rendent le mieux adapté à un travail de biophysique moléculaire. Sa sensibilité est de l'ordre de 5.10^{11} spins pour une raie de 1 gauss de largeur. Signalons que dans l'étude des cristaux on peut utiliser des montages 8mm, plus sensibles (5.10^{9} spins) mais qui ne conviennent guère pour l'étude des solutions.

3) Détermination quantitative du nombre de spins

Cette détermination est certainement le point le plus délicat de l'expérimentation en R. P. E.

a) le nombre de spins qui participent à la résonance est proportionnel à la surface de la courbe d'absorption. soit g (H) cette courbe :

$$\int_{-\infty}^{\infty} g\ (H)\ dH = k\ N$$

Comme la courbe expérimentale est une dérivée première, pour obtenir le nombre de spins il faudrait intégrer deux fois. Cette double intégration est à la cause d'erreurs importantes. On peut l'éviter en employant la méthode des moments basée sur la remarque suivante :

$$\int_{-\infty}^{\infty} g\ (H)\ d\ H = \left[g\ (H)\ dH\right]_{-\infty}^{\infty} - \int g'\ (H)\ \ HdH$$

Or, pour des courbes lorentziennes ou gaussiennes le terme $\left[g\ (H)\ dH\right]_{-\infty}^{\infty}$ s'annule donc $\left| \int_{-\infty}^{\infty} g'\ (H)\ \ H\ d\ H \right| = kN.$

La comparaison des moments premiers se fait d'une façon commode avec une balance conçue par BURGESS (97), les courbes étant obtenues à l'aide d'une double cavité analogue à celle de KÖHNLEIN et MULLER (98).

b) dans le cas où l'on a des courbes simples, d'allure lorentzienne, on peut aller plus vite.

$N = k\ S$ (surface de la courbe d'absorption)
$= k'M_1$ (moment premier de la courbe dérivée)
$= k''A\ (\Delta H)^2$ A = amplitude de la courbe dérivée
ΔH = largeur entre pics de la courbe dérivée.

Pour comparer deux échantillons on peut écrire en supposant toute chose égale par ailleurs :

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{A_1\ (\Delta H_1)^2}{\underset{\sim}{H}_1} = \frac{\underset{\sim}{H}_2}{A_2\ (\Delta H_2)^2}$$

$\underset{\sim}{H}_1$ et $\underset{\sim}{H}_2$ étant les amplitudes de modulation.

c) dans la pratique la détermination du nombre absolu de spins est certainement une des plus grandes difficultés de la R P E. Il faut en effet :

1) posséder un échantillon de référence dont on a déterminé à l'avance le nombre de centres avec une précision suffisante.

2) appliquer l'une des méthodes décrites ci-dessus.

3) déterminer le mieux possible les conditions expérimentales. Le remplacement de l'échantillon de référence par l'échantillon à mesurer dans la cavité comporte quelques risques : il faut que la géométrie des échantillons soit strictement identique et surtout que leur absorption diélectrique soit également la même pour pouvoir faire une comparaison valable. Or, dans la pratique, ces conditions ne sont que très rarement réalisées.

- FOERSTER (99) a proposé une méthode de substitution avec un échantillon de référence fixe. LUHIEWICZ (100) utilise un standard dans une cavité cylindrique autour de laquelle il fait tourner l'électro-aimant.

Mais la meilleure méthode est certainement l'emploi d'une double cavité. On a en effet $N_1 = \frac{M_1 A_1 B}{G_1}$ $N_2 = \frac{M_2 A_2 B}{G_2}$

M_1 et M_2 = moment des courbes dérivées
A_1 et B_2 = facteur dépendant de l'amplitude de la modulation
B = facteur dépendant du réglage du pont hyperfréquence.
a et b les 2 cavités

$$N_1 = N_2 \left[\frac{M_{1a}}{M_{2b}} \cdot \frac{b_{2b}}{G_{1a}} \quad \frac{M_{1b}}{M_{12}} \quad \frac{b_{2a}}{G_{1b}} \right]^{1/2}$$

II. 4- AUTRES MONTAGES EXPERIMENTAUX

1/ DISPOSITIF D'ENREGISTREMENT SIMULTANE DE LA PHOSPHORESCENCE ET DE LA R. P. E. (Figure 6)

La R. P. E. permet d'étudier la population moyenne de l'état triplet à un instant donné alors que par l'étude de la phosphorescence on ne s'intéresse qu'aux molécules donnant lieu à une désactivation radiative. Il nous a paru intéressant de monter un dispositif permettant d'enregistrer simultanément la phosphorescence et la résonance magnétique et d'étudier les décroissances en fonction du temps. Comme nous le verrons, nous n'avons détecté de cette façon aucune anomalie dans ces décroissances.

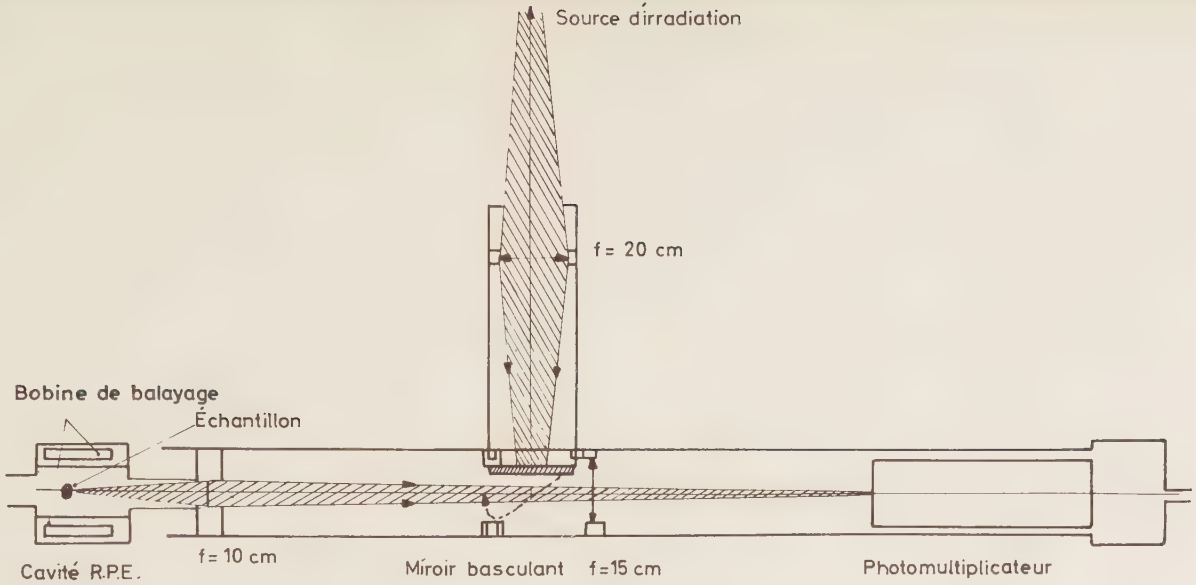
Etant donné les intensités lumineuses élevées qu'il est nécessaire d'employer pour avoir une population suffisante de triplets pour la R. P. E. c'est aussi une méthode de contrôle d'éventuelles dégradations photochimiques. Le principe de l'appareil est d'utiliser un miroir basculant qui permet, soit d'irradier l'échantillon, soit d'obturer la source et de découvrir un photomultiplicateur qui détecte l'émission de phosphorescence.

Un emplacement a été prévu pour intercaler des filtres ou un monochromoteur de façon à pouvoir faire une étude spectrale de l'émission. La méthode a l'avantage d'enregistrer l'émission dans la direction suivant laquelle l'échantillon a été irradié. Pour les verres et surtout pour les poudres, on obtient de cette façon un gain appréciable de sensibilité par rapport aux méthodes classiques. Si ce gain n'est pas obligatoire lorsqu'on le compare à la R P E qui est beaucoup moins sensible, il deviendra intéressant en spectrophosphorimétrie.

2/ SPECTROPHOSPHORIMETRE AMINCO-KEIRS

C'est un appareil qui permet d'enregistrer la fluorescence et la phosphorescence de composés solides ou en solution, à la température ordinaire où à 77°K. Deux réseaux permettent la monochromatisation de l'excitation et de l'émission. Il n'y a pas de correction de l'intensité de la lumière excitatrice en fonction de la longueur d'onde, ce qui conduit à des spectres d'excitation différents de la courbe d'absorption.

L'obtention des rendements quantiques nécessite l'emploi de composé échantillon étalon tel que benzopyrène. Le relevé des courbes d'excitation est néanmoins très précieux pour l'étude comparitive d'échantillons d'une même série. L'utilisation d'un phosphoroscope comportant deux fenêtres diamétralement opposées et tournant à une vitesse variant entre 200 et 7000 t/mn permet d'étudier commodément la phosphorescence. L'étude des durées de vie se fait



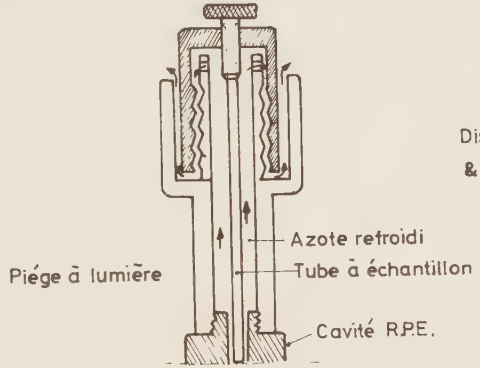


Fig. 6

Dispositif d'enregistrement simultané de la phosphorescence & de la résonance magnétique (Schéma de principe)

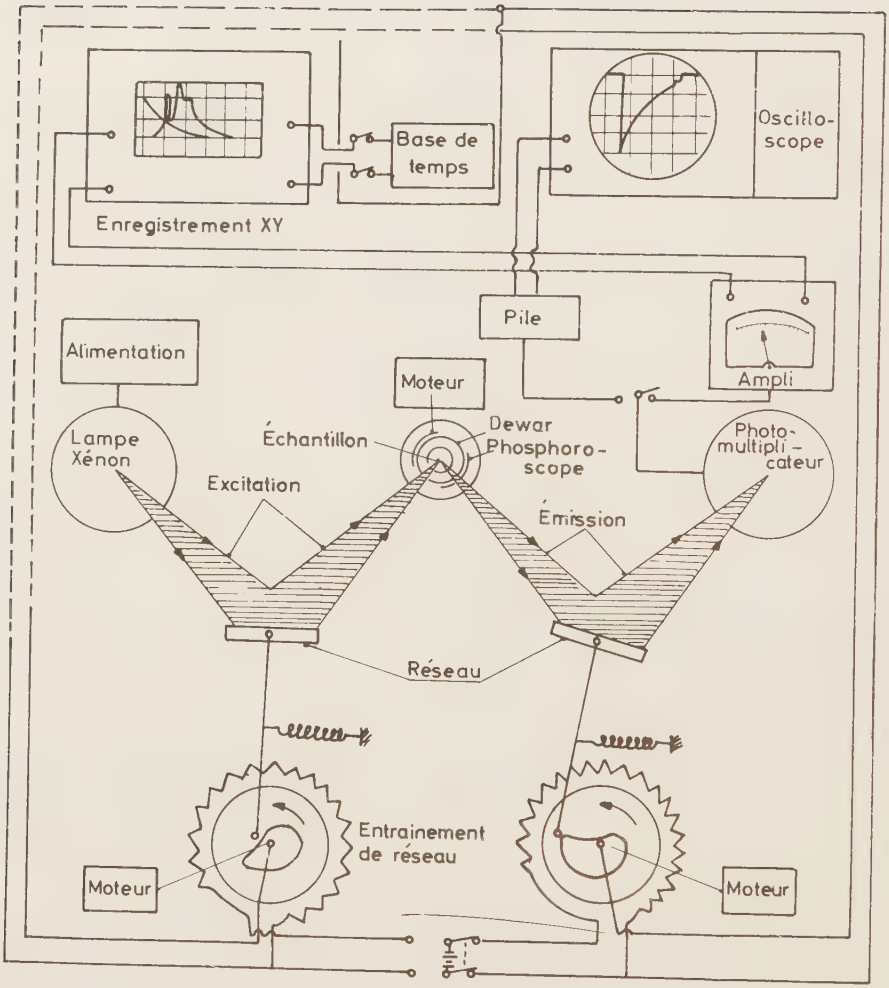

Base de temps
Oscillo-scope
Enregistrement XY
Pile
Alimentation
Moteur
Ampli
Lampe Xénon
Échantillon
Dewar
Phosphoro-scope
Photo-multipli-cateur
Excitation
Émission
Réseau
Entrainement de réseau
Moteur
Moteur
MONOCHROMATEUR D'ÉXCITATION
MONOCHROMATEUR D'ÉMISSION

Fig. 7

à l'aide d'un oscillographe TEKTRONIX, type 502 auquel est adaptée une caméra POLAROID qui permet de photographier commodément les courbes de décroissance

Voici quelques caractéristiques de l'appareil :

Sensibilité 4.10^{-2} lumen par division au maximum d'amplification
Bandes spectrales étudiées : 200 à 800 $m\mu$
Photomultiplicateur 1P28 : max. de sensibilité vers 350 $m\mu$

Les jeux de liaisons mécaniques et la précision des potentiomètres de balayage rendent souvent nécessaire l'étalonnage en longueur d'onde. On peut néanmoins considérer que ces longueurs d'ondes sont définies avec une précision de 1 à 2%.

*

CHAPITRE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX INTERPRETATION

a) Avant de présenter l'étude optique et magnétique des états excités et de quelques réactions photochimiques, il est nécessaire de rappeler, en les précisant, quelques résultats concernant l'absorption des acides aminés aromatiques, des peptides et des protéines.

Il apparait en effet que l'oubli de deux faits expérimentaux importants : l'absorption non négligeable des acides aminés soufrés dans la région de 250mμ et l'absorption au contraire très faible de la liaison peptidique dans ce même domaine, puisse conduire à des interprétations discutables des propriétés photochimiques (23) ou plus généralement photoélectroniques des protéines.

b) Les composés utilisés ont été fournis par :

- MANN RESEARCH Lab. (qualité : chromotographiquement pur) et en partie par :
- SIGMA CHEMICAL Co.
- YEDA Research and Development Co.

Nous n'avons pas fait de purification supplémentaire. Comme nous allons le voir, les spectres d'absorption et d'émission qui sont des tests particulièrement sensibles nous permettent de conclure à une pureté très satisfaisante de ces composés.

c) Différents types de solvant ont été utilisés en fonction des conditions de concentration, de température etc... nécessitées par l'expérimentation. L'eau est évidemment le solvant préférentiel. Pour obtenir des concentrations plus importantes ou pour travailler à basse température nous avons été amenés à utiliser une gamme de solvants organiques non classiques. Précisons bien que l'utilisation de tels milieux est particulière aux études spectroscopiques. C'est un moyen d'isoler la molécule et d'obtenir des réponses caractéristiques des transitions électroniques mises en jeu. Il ne s'agit pas d'une étude de morphologie ou de réactivité chimique qui doit au contraire être faite dans le milieu biologique, c'est-à-dire en milieu aqueux. Pour chaque expérimentation nous préciserons la nature des solvants étant bien entendu qu'ils sont tous de "pureté spectroscopique".

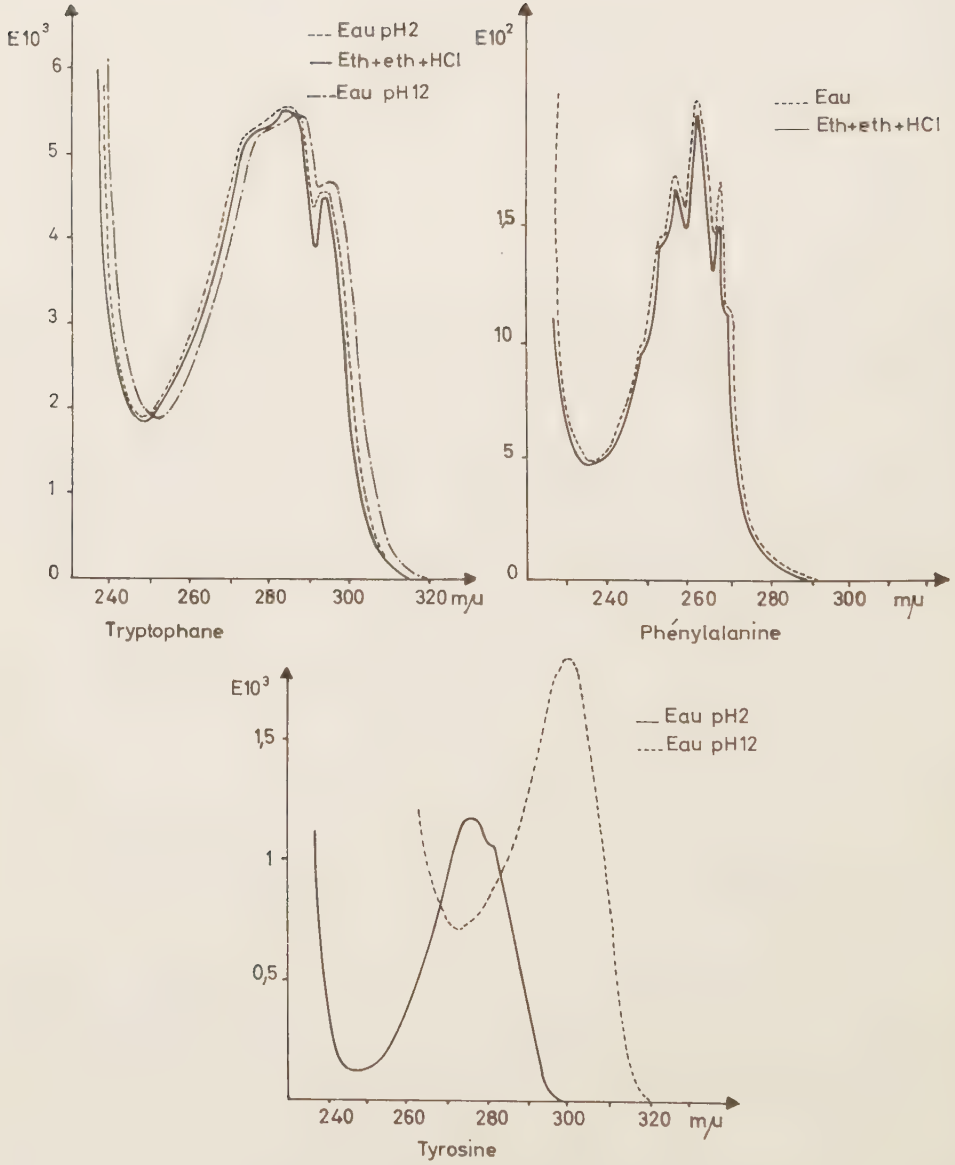


Fig. 8 Spectre d'absorption des acides aminés aromatiques.

I. SPECTRES D'ABSORPTION DES ACIDES AMINES (Figure 8)

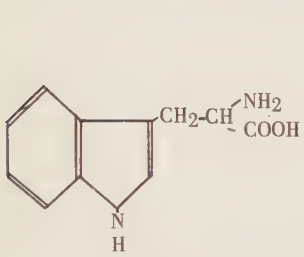
Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre CARY 15.

L'étude de l'absorption dans l'ultra-violet des acides aminés a été surtout développée pour permettre une caractérisation rapide et cependant précise des protéines (11).

Au cours de cette étude on est amené à séparer les deux régions spectrales suivantes :

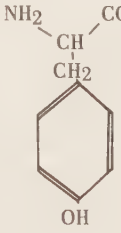
$$250\ m\mu < \lambda < 320\ m\mu \qquad \lambda < 250\ m\mu$$

Sur les 18 acides aminés fondamentaux, quatre seulement absorbent dans la région 250-320 mμ. Les trois acides aminés aromatiques pour lesquels les groupements chromophores sont les noyaux indol, phényl et phénol, et un acide aminé soufré contenant le groupement caractéristique -S-S

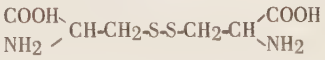


Tryptophane

Phenylalanine



Tyrosine



Cystine

La phénylalanine se caractérise par un coefficient d'extinction moléculaire particulièrement faible ($\varepsilon_{max} \simeq 200$) comparativement à la tyrosine ($\varepsilon_{max} \simeq 1350$) et surtout au tryptophane ($\varepsilon_{max} \simeq 5600$) A titre de comparaison nous avons porté sur un même graphique (Figure 9) les spectres d'absorption de ces différents composés.

A titre indicatif nous avons fait figurer la courbe d'absorption de la cystéine :

$$HS - CH_2 - CH \begin{matrix} NH_2 \\ COOH \end{matrix}$$

L'absorption de la cystéine avait été négligée jusqu'aux récents travaux de DEDEKEN et Coll. (12) qui ont montré l'augmentation considérable du ε_{max} en milieu alcalin.

Les spectres d'absorption du tryptophane et de la phénylalanine varient très peu en fonction du pH de la solution. Par contre l'ionisation du groupement hydroxyle de la tyrosine conduit à un déplacement considérable du spectre lorsqu'on passe d'un milieu acide à un milieu fortement basique : effet bathochrome $\Delta\lambda_{max} \simeq 20$ mμ, et hyperchrome $\varepsilon_{max} \times 2$ (Figure 8).

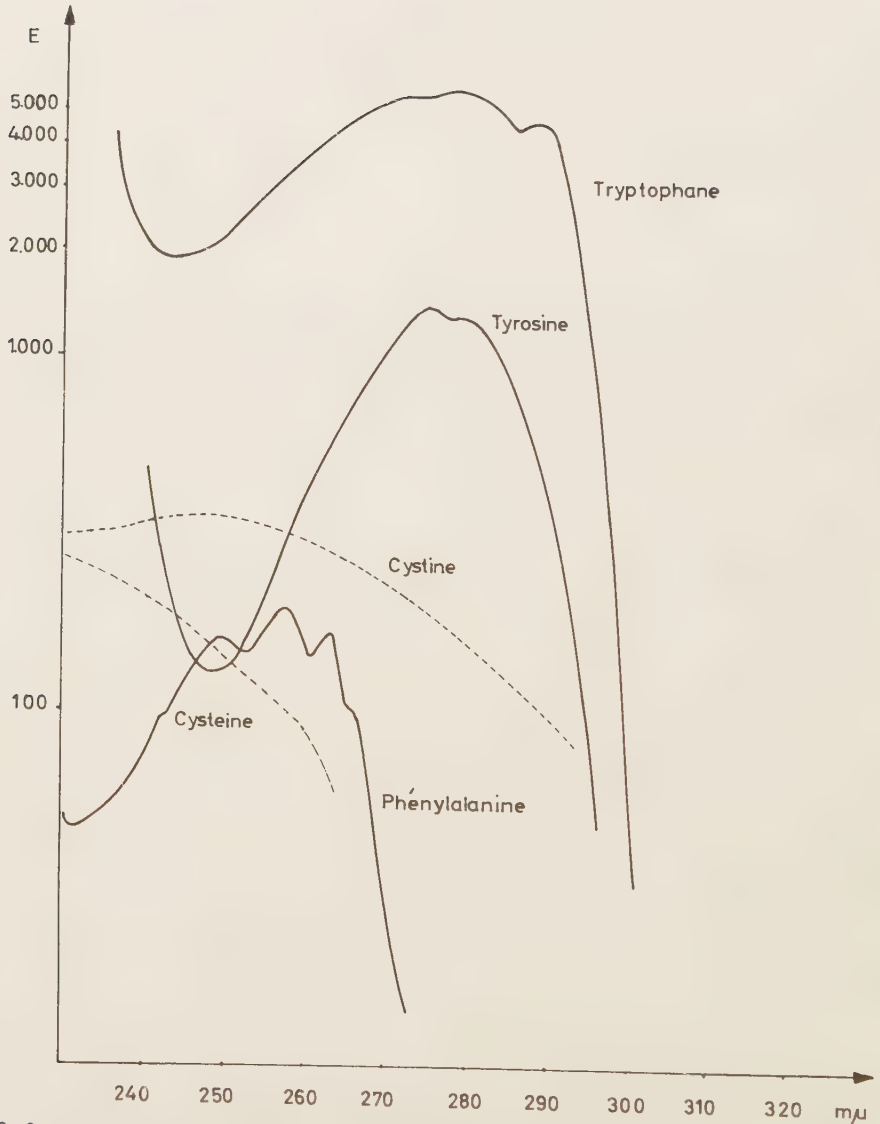
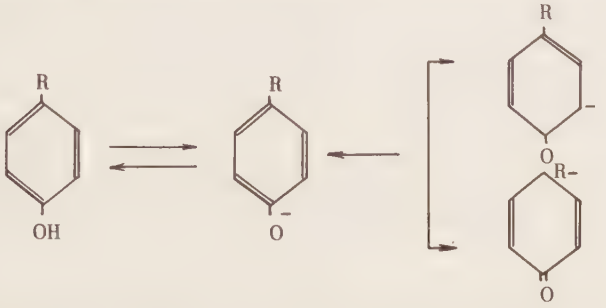


Fig. 9 Comparaison des courbes d'absorption des differents acides aminés à pH neutre.

Par les formules suivantes on rend compte de la stabilisation du premier état excité par l'apparition de formes résonantes d'énergie plus basse.



Comme nous le verrons le groupement ionisable OH confère à la tyrosine des propriétés également particulières en émission puisqu'il est susceptible d'interagir avec les états excités de la molécule ou de molécules voisines telles que le tryptophane.

II. SOLVANTS NON AQUEUX

Pour l'étude des états triplets nous avons utilisé des solvants particuliers donnant des verres à basse température. Le plus classique de tous les solvants de ce genre est l'EPA (éther, isopentane, alcool éthylique dans les proportions : 5 : 5 : 2). Pour obtenir des solubilités convenables nous avons été amenés à :

- ajouter du HC1 (à des concentrations de l'ordre de 10^{-2} M/litre)
- à modifier les proportions (5 parties d'alcool pour 2 parties d'isopentane)
- à utiliser un nouveau mélange ne contenant pas d'isopentane : alcool éthylique + éther (2 : 1) + HC1.

D'une façon plus générale nous pouvons dire que les acides aminés aromatiques :

- sont solubles dans des mélanges alcool-eau
- sont légèrement solubles dans les alcools méthylique et éthylique avec lesquels il est possible d'obtenir de bons verres à basse température dans des tubes de faible diamètre. On peut augmenter considérablement la solubilité dans les alcools en ajoutant HC1 (concentration 10^{-2} M/litre).
- sont également solubles dans des mélanges de solvants organiques : alcool + éther, diméthylformamide (DMF), DMF + éther, DMF + alcool, etc... en rajoutant du HC1 si c'est nécessaire.

Pour obtenir de bons verres à basse température il suffit le plus souvent d'utiliser un solvant bien déshydraté et d'ajouter de l'éther éthylique dans des proportions de l'ordre du tiers. Le fait de travailler dans des tubes de faible diamètre joue un rôle favorable pour l'obtention des verres dans le cas du mélange alcool-éther.

Pour les acides aminés on peut utiliser d'autres solvants : mélange glucose-eau (mauvaise transmission dans l'uv, impuretés) acide acétique, acide fluoroacétique. La complexité des phénomènes photochimiques obtenus nous ont conduit à remettre leur utilisation à une étape ultérieure. Au cours de l'étude de la phosphorescence nous parlerons de solvants d'un type différent : alcool polyvinylique, acétate de cadmium, borates, intéressants par leur rigidité à la température ordinaire.

En ce qui concerne le solvant le plus utilisé (alcool, éther + HC1) nous n'avons pas constaté de changement majeur dans le spectre d'absorption. La résolution du spectre, en particulier pour la phénylalanine, est légèrement améliorée.

III. UTILISATION DES BASSES TEMPERATURES

Ce même solvant permet de relever les spectres d'absorption à la température de l'azote liquide (77°K). Nous avons utilisé pour cela une cellule spéciale adaptable au CARY 15 et réalisée au laboratoire par C. HELENE.

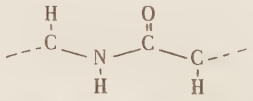
Pratiquement on n'obtient pas d'augmentation appréciable de la résolution. Le spectre de la phénylalanine déjà très bien résolu à la température ordinaire n'est pas modifié. Dans le cas du Tryptophane, BEAVEN (11) signale l'apparition à 77°K d'une structure à 290 mμ. Pour notre part nous n'avons pas relevé de modification importante de la structure existant à la température ordinaire et qui est bien résolue.

IV. PEPTIDES. PROTEINES

On dispose actuellement d'un grand nombre de di, tri et polypeptides et il est possible de faire une étude systématique des spectres d'absorption en allant de combinaisons simples comportant deux ou trois motifs jusqu'au copolymère comportant une centaine ou plus de "résidus".

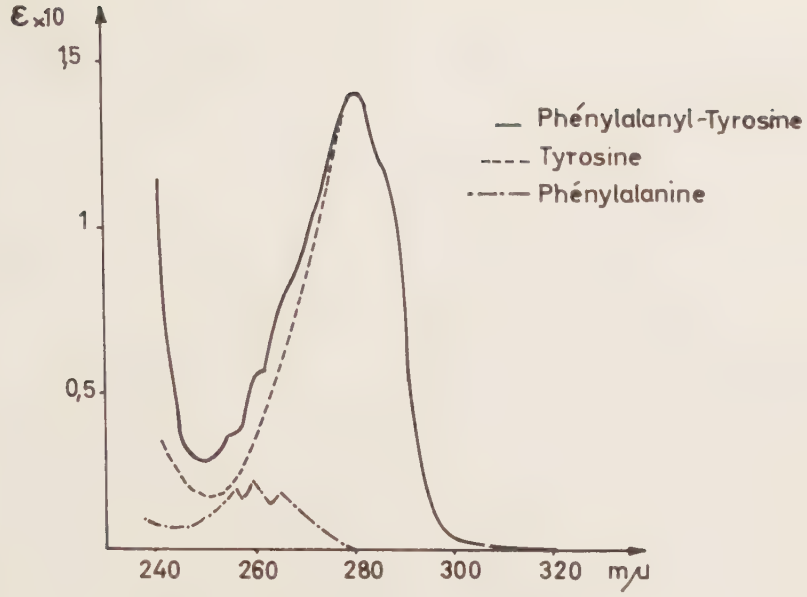
Pour notre étude il nous a paru intéressant de relever les points suivants :

a) le groupement suivant qui comporte la liaison peptidique



isole bien les groupes chromophores d'acides aminés combinés. Et dans les structures habituelles, hélicoïdales ou non, on admet que les cycles n'ont pas d'intéraction appréciable.

La courbe d'absorption d'un dipeptide est la superposition des courbes de chacun des constituants. C'est ainsi que dans la zone 250-320 mμ l'adjonction de restes aliphatiques ne modifie pas l'absorption due au groupement aromatique. Sur la figure 10 sont figurés, d'une part, les spectres d'absorption de la phénylalanyl-tyrosine dont la courbe représente bien la superposition des courbes de la phénylalanine et de la tyrosine et d'autre part les spectres de la



Spectre d'absorption d'un dipeptide

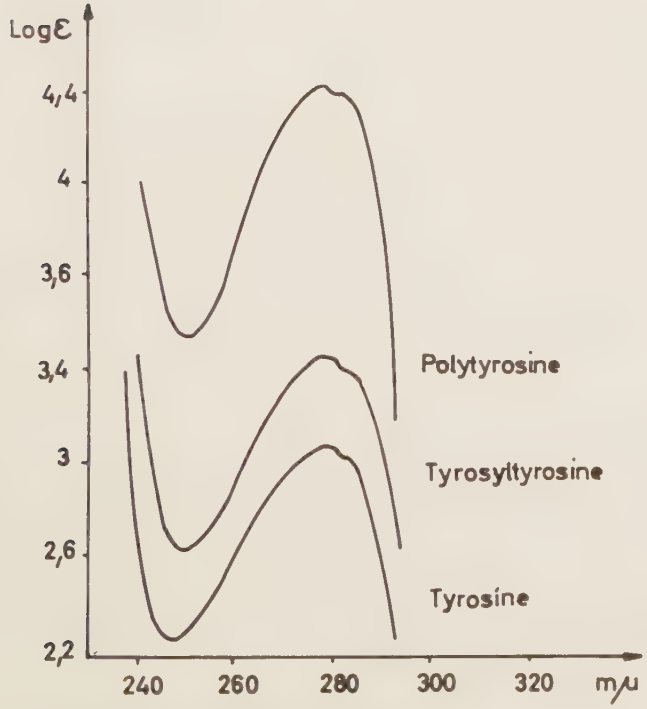


Fig. 10 **Spectre d'absorption de la tyrosine & des peptides**

tyrosine, de la tyrosyl-tyrosine et de la poly-tyrosine ($M \simeq 6300$) pour lesquelles on voit que la loi d'additivité peut être raisonnablement adoptée. Rappelons néanmoins que KATCHALSKI (13) obtient des diminutions relatives de coefficient d'extinction moléculaire pour les polypeptides qu'il attribue à une interaction des orbitales de deux chromophores aromatiques. Une telle éventualité n'est pas à envisager dans le cas des protéines.

En ce qui concerne les protéines on peut admettre en première approximation que le spectre d'absorption dans la région 240-320 mμ est celui des différents acides aminés aromatiques qui entrent dans sa composition. On relève souvent un léger déplacement ($\simeq 20$ Å) du maximum vers le rouge et une augmentation de quelques pour cent de l'absorption maximum par rapport au mélange d'acides aminés correspondant ou au polypeptide. Ces variations n'ont pas reçu d'interprétation satisfaisante jusqu'à maintenant. Il faut se souvenir des grandes difficultés expérimentales pour obtenir un composé réellement exempt d'impuretés. De nombreux auteurs ont néanmoins cherché à exprimer quantitativement la contribution de la liaison -CONH- dans la région 240-320 mμ et la valeur actuellement admise est $\varepsilon_{CONH} \simeq 1$ à 253,7 mμ. Etant donné l'importance des études photochimiques faites à 253,7 mμ, cette contribution peut être importante dans le cas des protéines mais nous rapellons (Figure 9) qu'en dehors des acides aminés aromatiques le groupement -S-S des acides aminés soufrés a une absorption importante à cette longueur d'onde et qu'il joue le rôle essentiel au cours de la dégradation photolytique.

L'étude de l'absorption de la liaison peptidique doit en fait se faire dans la région $\lambda < 240$ mμ. L'étude des polypeptides et des protéines permet de mettre en évidence un maximum d'absorption dans la région 1800-2000 Å qu'il convient d'attribuer à la liaison peptidique. Les acides aminés aromatiques possèdent dans cette région des coefficients d'extinction moléculaire élevés :

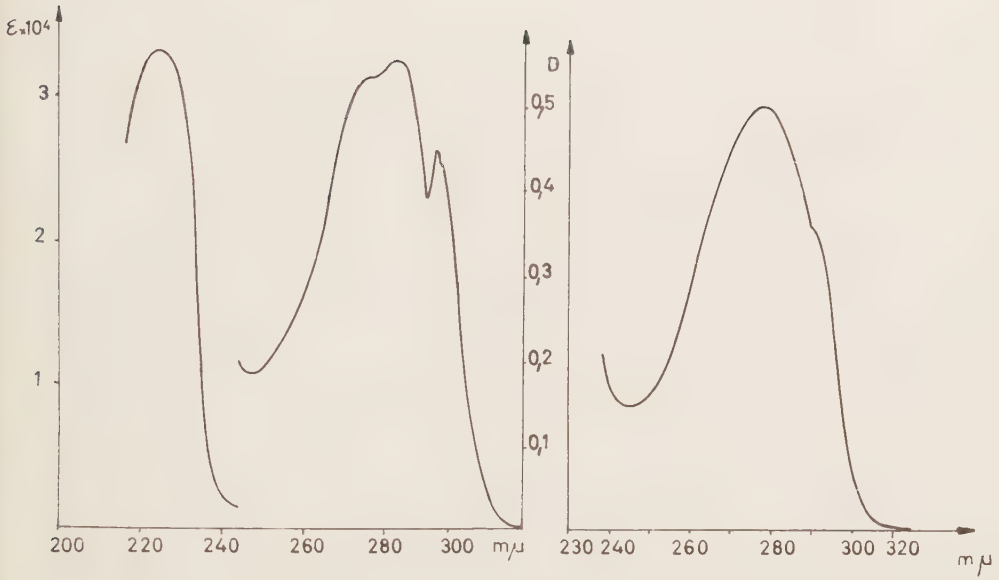
$\varepsilon_{1900\ \text{Å}}$: pour le tryptophane $\simeq$ 20.000
la tyrosine $\simeq$ 35.000
la phénylalanine $\simeq$ 2.500

Mais pour interpréter la valeur du coefficient d'extinction moléculaire d'une protéine à cette longueur d'onde il faut attribuer 60 à 70 % de l'absorption à la liaison peptidique. (C'est le cas de la chymotrysine). Etant donné que l'on néglige l'absorption due aux restes aliphatiques puisque pour l'alanine $\varepsilon_{1900\ \text{Å}} \simeq 100$.

Comme pour les résidus, l'absorption de la liaison peptidique peut varier légèrement avec l'environnement c'est à dire avec l'ionisation des groupements carboxy- et amino- ou avec la structure hélicoïdale ou en pelote statistique du peptide ou de la protéine. Mais en aucun cas les spectres d'absorption ne permettent de conclure à l'existence d'une hyperconjugaison de deux ou plusieurs peptides à travers les carbones saturés de cette liaison.

On sait cependant l'importance accordée par les théoriciens tels que B. PULLMAN (14) à l'existence d'une éventuelle conjugaison du squelette peptidique.

En conclusion on voit que l'absorption ne permet guère d'accéder à des propriétés réellement supramoléculaires des polypeptides et des protéines.



Absorption du tryptophane $\lambda < 250\ m\mu$ — Absorption de la sérumalbumine

Fig. 11

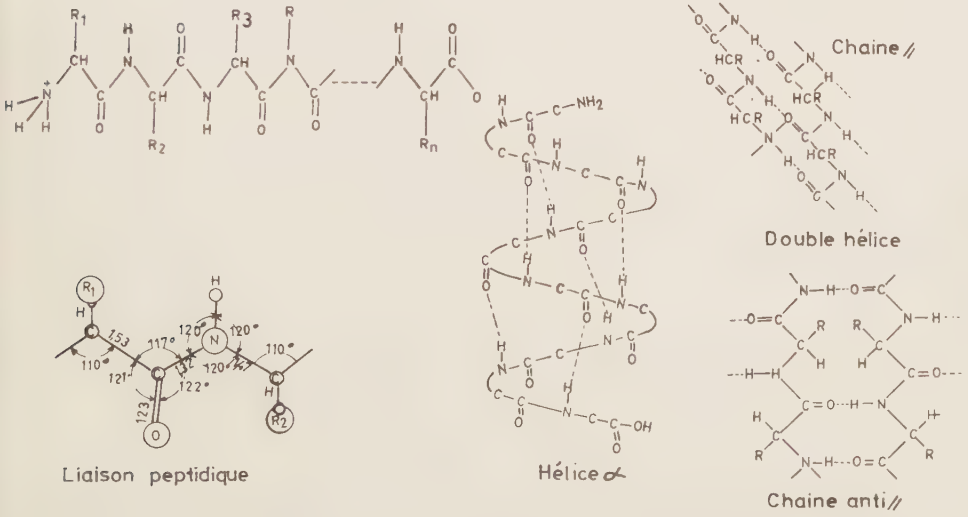


Fig. 12 Structure des peptides

On peut dégager les quelques points essentiels suivants :

180 200 220 240 260 280 300 320 (mμ)

Région du maximum d'absorption de la liaison peptidique

- Pas de conjugaison

a) Acides aminés aromatiques :

	λm	ε m
Tryptophane	280 mμ	5600
Tyrosine	275 mμ (pH acide)	1350
Phénylalanine	260 mμ	200

ε à 205 mμ

a) Acides aminés soufrés (15)

Cysteine	2200
Cystine	690
Methionine	1830

b) Histidine 5200

b) Cystine : 250 mμ 350

c) Polypeptides ; protéines = Somme des résidus aromatiques

- Pas d'interaction notable par contact ou par conjugaison entre les chromophores.

- Liaison peptidique $\varepsilon_{253,7\ m\mu} \simeq 1$.

2ème Partie - III. 2 - ETUDE DES ETATS EXCITES : FLUORESCENCE ET PHOSPHORESCENCE

Comme nous l'avons déjà signalé il est possible de réaliser des études comparatives de luminescence valables avec le spectrophotomètre AMINCO, sans faire de corrections importantes des spectres. Le fait que de très nombreux résultats de la littérature sont publiés sans corrections nous permettra le cas échéant de faire d'utiles comparaisons.

Pour les études quantitatives, lorsque les corrections sont nécessaires nous avons utilisé la méthode classique de PARKER et REES (16).

III. 2. A. FLUORESCENCE

Les propriétés émissives remarquables des amino-acides aromatiques furent mis en évidence par DEBYE et EDWARDS (1) en ce qui concerne la phosphorescence et par TEALE et WEBER (17) pour la fluorescence.

Depuis cette date de nombreux développements ont été donnés à l'étude de la fluorescence en particulier par WEBER (18), qui par ses études de polarisation de fluorescence s'est plus particulièrement intéressé au phénomène de transfert de l'énergie. D'autres résultats ont été obtenus sur l'action du pH, de la température etc..., sur la fluorescence des acides aminés aromatiques isolés ou inclus dans des protéines et nous citerons plus particulièrement les travaux de A. WHITE (19), de R. W. COWGILL (20) et de J. A. GALLY et G. M. EDELMAN (21).

Les acides aminés aromatiques constituent des composés de choix pour l'étude de l'influence des groupements adjacents, et d'une façon plus générale de l'environnement sur la fluorescence des chromophores. C'est donc un moyen de préciser les interactions électroniques entre les composants de l'édifice protéique et d'aborder éventuellement l'influence de la structure macromoléculaire sur des phénomènes plus spécifiques, par exemple, le transfert de l'énergie.

La tyrosine est particulièrement remarquable à ce point de vue puisqu'elle permet d'étudier l'influence des trois groupements ionisables : OH, COOH, NH_2 sur les états excités du noyau benzénique. De son côté le tryptophane permet de préciser l'influence des groupements COOH et NH_2 sur les états excités du noyau indolique.

Dans des peptides du type : glycyl-tyrosine on verra l'influence de la liaison peptidique sur la fluorescence. Les polypeptides et les protéines représentant les cas les plus complexes où toutes ces interactions se superposent aux interactions plus spécifiques dues à la structure hélicoïdale ou en pelote statistique. Contrairement à ce qui se passe en absorption, la fluorescence de la macromolécule ne sera pas la somme des émissions de ses résidus aromatiques puisqu'il y a un effet important de l'environnement et la possibilité de transfert d'énergie.

1. Fluorescence des acides aminés aromatiques

Pour rendre commode une étude en fonction du pH, la fluorescence a été enregistrée en solution aqueuse à la température ordinaire.

La position relative des maxima d'émission est donnée sur la figure 13. Il est remarquable de constater que le spectre d'émission de la phénylalanine ne présente aucune structure fine contrairement au spectre d'absorption dont nous avons vu qu'il est très bien résolu à la température ordinaire. Il y a donc une interaction dipolaire importante entre l'état excité et la molécule d'eau. L'utilisation de solvants organiques ou des basses températures ne nous ont

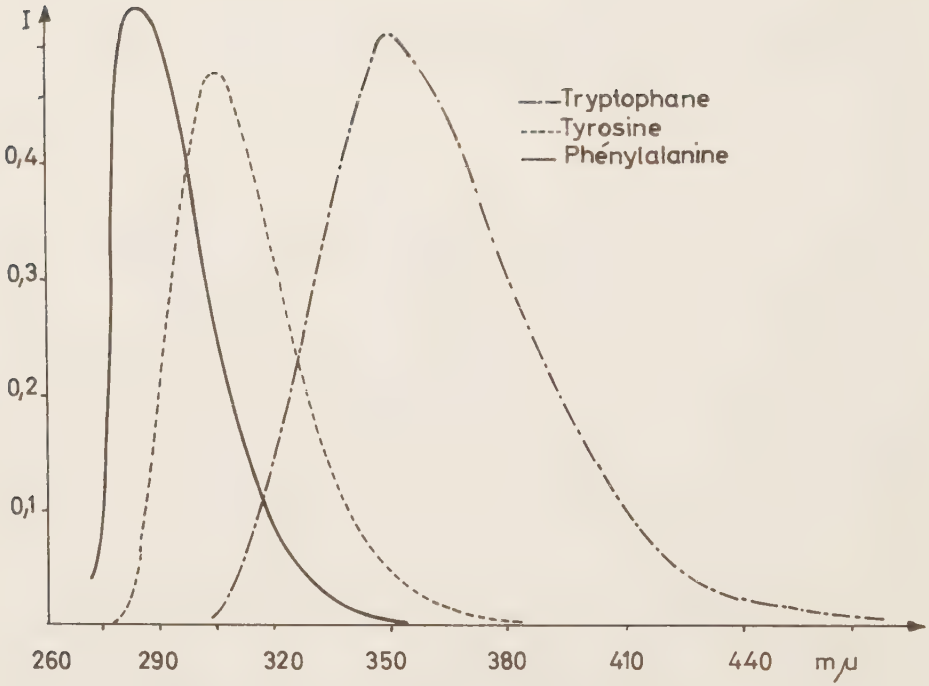


Fig. 13 Position relative des spectres de fluorescence

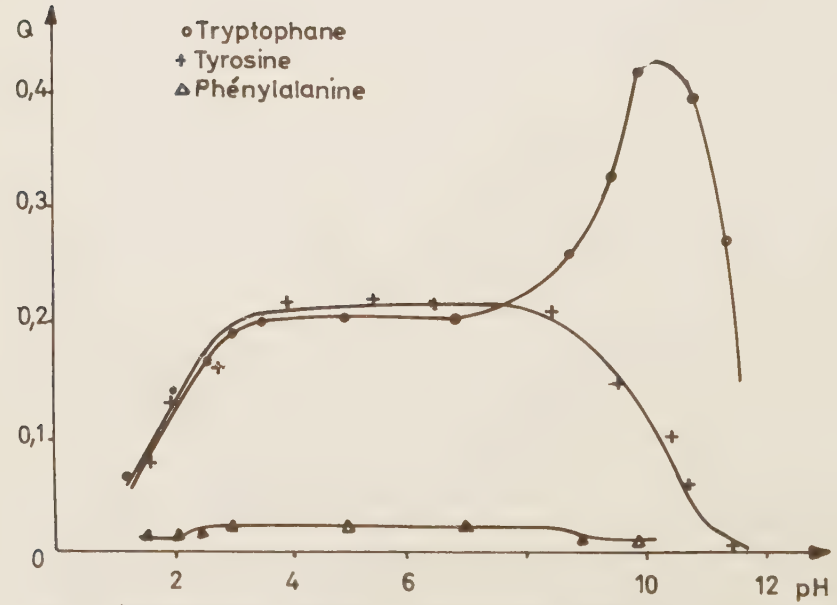


Fig. 14 Influence du pH sur le rendement quantique de fluorescence

cependant pas permis de retrouver une structure. La recherche de solvants d'un type entièrement différent conduisant par exemple à la formation de cristaux mixtes dont nous reparlerons et l'utilisation de spectrographe à grande dispersion nous permettront peut être de mieux résoudre ce problème.

Pour la phénylalanine et surtout pour le tryptophane, il n'y a pas de recouvrement appréciable des spectres d'absorption et d'émission. Par contre pour la tyrosine ce recouvrement est important. Il peut donc y avoir réabsorption de la fluorescence en particulier en milieu alcalin et pour des cellules de 5mm ou plus d'épaisseur il conviendra de faire une correction pour la détermination des rendements quantiques de fluorescence.

Pour ces rendements quantiques, nous adopterons les valeurs absolues données par TEALE et WEBER (17) pour des solutions aqueuses à pH neutre :

	Am	Em	Q
Phénylalanine	260 mμ	284 mμ	0,04
Tyrosine	278 mμ	305 mμ	0,21
Tryptophane	281 mμ	350 mμ	0,20

A_m et E_m désignant respectivement la position des pics d'absorption et des pics d'émission.

2. Influence du pH

Le rendement quantique de fluorescence Q est égal au rapport du nombre de quanta émis au nombre absorbés par la solution. L'intensité de fluorescence F qui est proportionnelle à la surface S de la courbe d'émission varie aussi comme

$I_o (1 - 10^{-\varepsilon c d}) \times Q$ où ε = coefficient d'extinction moléculaire
c = concentration de la solution
d = épaisseur optique
$\varepsilon cd = D$ = densité optique

Pour des solutions diluées F est proportionnel à : $I_o \varepsilon cd \times Q$

Pour un même appareil et pour une même intensité d'excitation on peut écrire que pour deux solutions 1 et 2 on a :

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{S_1}{S_2} = \frac{Q_1 \cdot \varepsilon_1 c_1 d_1}{Q_2 \cdot \varepsilon_2 c_2 d_2}$$

$$\boxed{\frac{Q_1}{Q_2} = \frac{S_1}{S_2} = \frac{D_2}{D_1}}$$

Pour les acides aminés aromatiques, les variations du pH n'affectent pas de façon significative la position et la forme des spectres d'émission. A intensité d'excitation constante il suffira donc de comparer les densités optiques et l'intensité des maximum d'émission pour obtenir la valeur relative des rendements quantiques.

Pour les courbes de résultats de la fig. 14, nous n'avons pas fait de correction c'est-à-dire que nous n'avons pas tenu compte de la réabsorption de fluorescence, de la transmission du monochromateur de sortie et surtout de la courbe de sensibilité spectrale du photomultiplicateur RCA, 1P28 équipant notre instrument. Si l'on tient compte des données du constructeur et de nos conditions de travail (cellules de 2mm d'épaisseur, concentration 10^{-4}M/litre) il semble raisonnable d'admettre une erreur de l'ordre de 10%.

Ces courbes sont en excellent accord avec les récents résultats de R.N. COWGILL (20) et J. FEITELSON (22) en particulier pour la tyrosine.

a) Tyrosine

Les solutions dans l'eau bidistillée ont été excitées au voisinage du point isosbestique c'est-à-dire vers 270mμ pour s'affranchir des variations du coefficient d'extinction moléculaire en fonction du pH. Un contrôle des densités optiques confirme la possibilité d'opérer de cette façon. De toute façon, dans tous les cas il est préférable de travailler à intensité d'excitation constante et de faire les corrections en fonction des variations de D plutôt que de faire intervenir la courbe d'émission de la lampe et la transmission du monochromateur d'entrée. Les pH acides sont obtenus par adjonction de HC1, les pH basiques par adjonction de NaOH. Les pH sont mesurés à l'aide d'un pH-mètre EIL étalonné avec des solutions tampons du commerce. Dans la région pH4-8 l'intensité de fluorescence ne varie pratiquement pas. En pH acide il y a une décroissance rapide de la fluorescence qui correspond bien au point de dissociation du groupement carboxyl ($pK_{COOH} \simeq 2,2$). Remarquons qu'il n'apparaît pas un effet de quenching important du à HCℓ contrairement aux résultats obtenus par A. WHITE (19). De la même façon nous trouvons que le taux de fluorescence entre pH 11-12 n'est pas entièrement nul. Le point milieu de la décroissance correspond bien à un changement de l'ionisation du groupement hydroxyl ($pK \simeq 10$). Au dessus de pH 11 il faut s'attendre à un quenching dû auxOH$^-$.

b) Trytophane

Etant donné qu'il n'y a pas de changement notable de l'absorption en fonction du pH les résultats sont ici obtenus avec une meilleure précision.

Les solutions sont faites dans l'eau bidistillée et le mode opératoire est identique à celui du cas précédent.

En milieu acide on observe parfaitement la décroissance analogue à celui de la tyrosine due au changement d'ionisation du COOH ($pK_{COOH} \simeq 2,3$). En milieu alcalin il y a une augmentation considérable à partir de pH 8. Le point milieu de la courbe correspond à l'ionisation du groupement amino ($NH_3^+ \rightarrow NH_2$, $pK \simeq 9,4$) qui agit donc de façon très importante sur l'émission de noyau indolique.

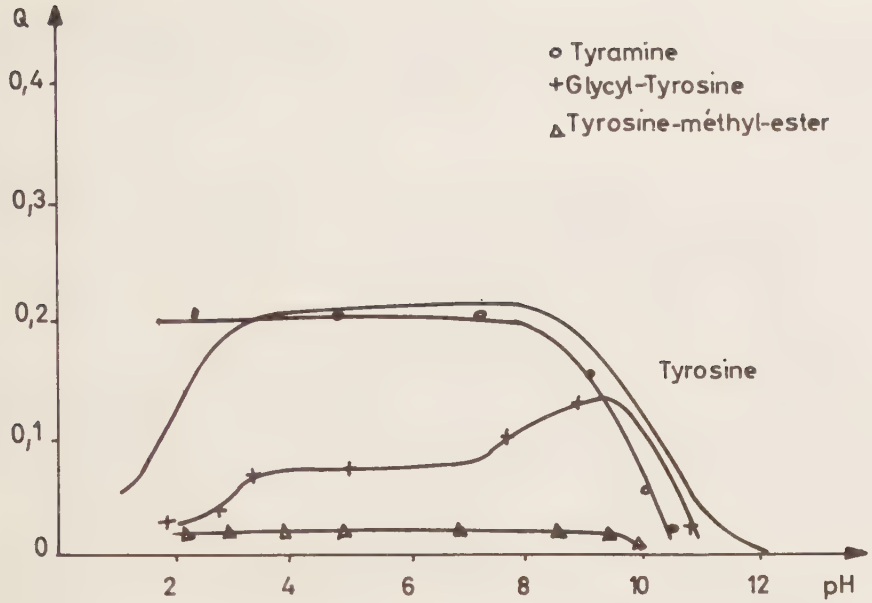


Fig. 15 Influence du pH sur la fluorescence des dérivés de la Tyrosine

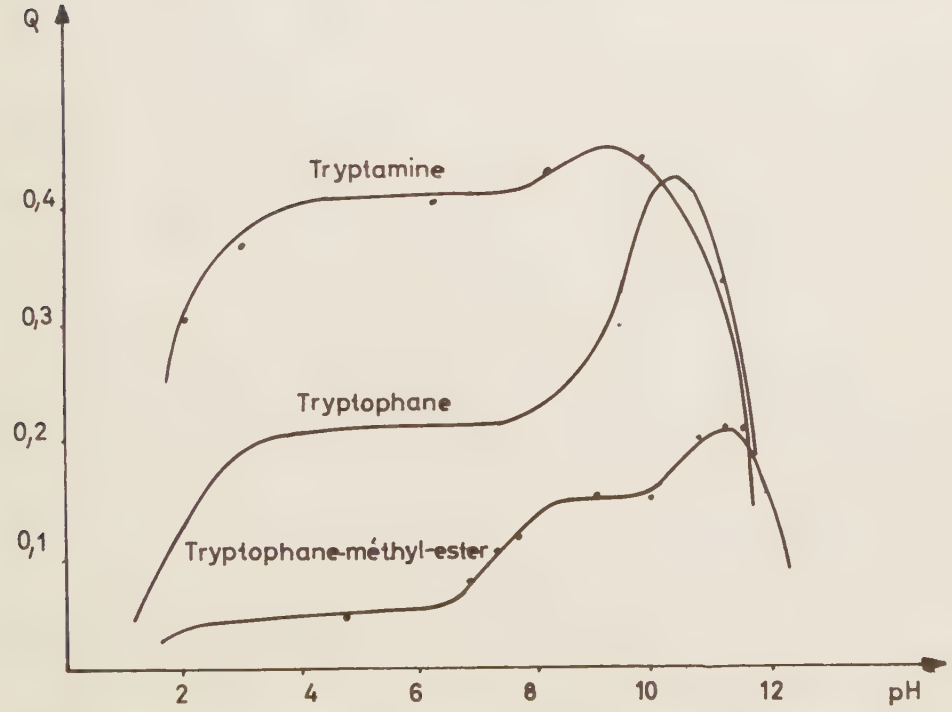


Fig. 16 Influence du pH sur la fluorescence des dérivés du Tryptophane

Comme nous allons le voir l'étude de certains dérivés de ces aminoacides confirme le fait que ces changements dans les rendements de fluorescence sont bien dus à des modifications de la structure ionique dans les régions pH1 - 4 et pH8 - 11.

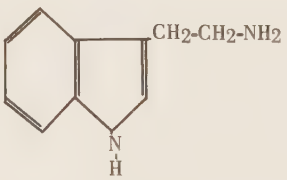
c) Phénylalanine

Cet acide aminé se caractérise par son rendement quantique très inférieur à ceux des composés précédents. La courbe montre également une diminution du rendement dans la région pH = 2 qui correspond au changement d'ionisation du COOH.

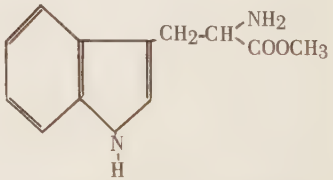
3. Fluorescence de dérivés et de peptides

L'influence de la structure ionique de la molécule sur ses propriétés de conversion interne est confirmée par l'étude de dérivés convenablement choisis. On pourra supprimer ou bloquer les groupements ionisables NH_2 et COOH en utilisant des composés tels que la tyramine ou la tryptamine ou les esters méthylés ou éthylés.

Tyramine

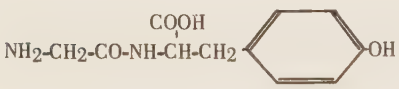


Tryptamine

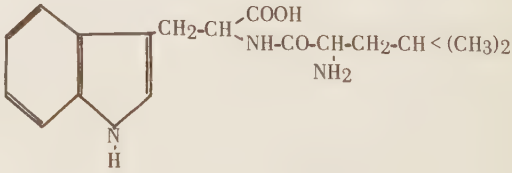


Tryptophane méthylester

Il est également possible d'engager l'un ou l'autre des groupements dans une liaison peptidique.

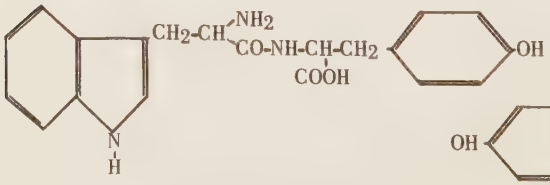


Glycyl-tyrosine

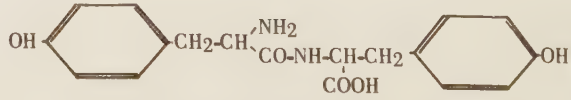


Leucyl tryptophane

On peut varier de cette façon la distance entre le chromophore et le groupement ionisable. Il est aussi possible d'utiliser des dipeptides aromatiques tels que :



Tryptophyl tyrosine



Tyrosyltyrosine

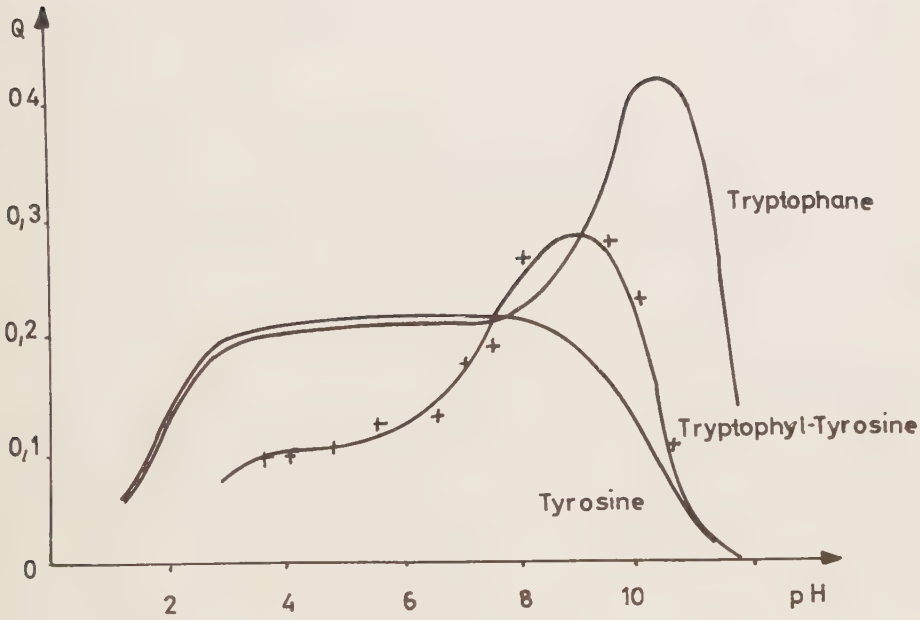


Fig. 17 Influence du pH sur la fluorescence d'un dipeptide

En plus de l'influence des groupements ionisables de la chaîne, il va apparaître l'influence de la liaison peptidique : CO-NH dont il faudra tenir compte pour les polypeptides et les protéines.

a) Tyrosine

Sur la figure 15 sont représentées les courbes de variation de la fluorescence en fonction du pH. Dans le cas de la tyramine la suppression du groupement COOH a un effet très net pour les pH acides puisqu'on obtient pratiquement une droite même pour pH < 2.

En milieu alcalin on obtient une courbe analogue à celle de la tyrosine due à l'ionisation du OH.

L'introduction d'un groupement glycyl sur le NH_2 de la tyrosine ou l'estérification de son COOH conduisant à une diminution importante du rendement quantique.

Pour la glycyl-tyrosine il apparaît un maximum au voisinage de pH = 10. L'augmentation dans la zone de pH : 7-10 n'a pas reçu d'interprétation exacte pour le moment. Elle montre l'influence importante de la nature de la chaîne latérale et une interaction éventuelle du cycle avec les groupements terminaux de cette chaîne. Une étude systématique des dipeptides haliphatiques de la tyrosine doit conduire à une meilleure compréhension de ce problème.

b) Tryptophane (Figure 16)

Les conclusions sont assez voisines des précédentes. L'influence de l'ionisation des groupements NH_2 et COOH se traduit par des variations importantes du rendement quantique dans les zones de pH 2-3 et 8-12. Dans le cas du Méthyl-ester de tryptophane nous obtenons une courbe à 2 paliers qui ne correspond pas aux résultats de WHITE (19). Il faut remarquer qu'en fait nos courbes ont été relevées en présence de NaCl, alors que les conditions de cet auteur ne sont pas précisées. Mais une explication possible de ce résultat serait d'admettre une estérification incomplète de l'acide aminé.

c) Phénylalanine

Nous n'avons étudié dans ce cas que l'ester méthylé dont la courbe de variation en fonction du pH s'accorde parfaitement avec les hypothèses précédentes puisque dans la zone de pH : 2-3 il n'y a plus de variation due à l'ionisation du COOH.

d) Dipeptides

1. d- L'introduction d'un groupement glycyl- sur la tyrosine ou d'un groupement leucyl- sur le tryptophane conduisent à une diminution importante du rendement de la fluorescence.

Gly-Tyrosine : $Q \simeq 0,07$
Leu-Tryptophane : $Q \simeq 0,08$

Dans ce cas l'effet inhibiteur provient essentiellement de la liaison peptidique dont on sait qu'elle a un caractère fortement électronégatif. Pour une liaison CO-NH, on a donc une diminution de fluorescence de l'ordre de 60%.

COWGILL (20) a pu mesurer le rendement quantique d'un tripeptide : Gly- Tyr. Glycinamide et trouve Q $\simeq$ 0,035, c'est-à-dire qu'il vérifie bien l'influence de la deuxième liaison peptidique.

2. d- Pour les dipeptides aromatiques nous pouvons dégager les règles suivantes :

α) Pour les peptides du type : Phe-Tyr (ou Tyr-Phe)
Phe-Tryp (ou Try-Phe)

il est impossible de distinguer la fluorescence de la phénylalanine. Les spectres d'excitation sont pratiquement identiques à ceux de la tyrosine ou du tryptophane. En absorption nous avons cependant vu qu'il est possible de retrouver la partie du spectre correspondant à la phénylalanine (une excellente sensibilité est obtenue en traçant un spectre différentiel) (Fig.10).

Remarques. Etant donné

a) la position respective des spectres d'absorption et aussi d'émission ;

b) la valeur relative des coefficients d'extinction moléculaire et des rendements quantiques (qui devrait par exemple conduire à une émission de la phénylalanine au moins 15 fois inférieure à celle de la tyrosine).

c) l'influence inconnue d'un cycle sur l'émission d'un cycle voisin;

d) la possibilité d'un transfert d'énergie, le pouvoir séparateur et la sensibilité de l'AMINCO, même dans les conditions optima, restent certainement insuffisants pour distinguer l'émission éventuelle du groupement phényl.

β) Pour les peptides du type : Tyr - Tryp ou Tryp - Tyr on ne recueille que la fluorescence du Tryptophane et le spectre d'excitation correspond sensiblement à celui du tryptophane. Là aussi il convient de prendre quelques précautions. On se souvient en effet que les spectres d'absorption de la tyrosine et du tryptophane sont très voisins en ce qui concerne la positions en longueurs d'onde. Du côté des grandes longueurs d'onde, les spectres se terminent à 300mμ pour la tyrosine et 310mμ pour le tryptophane (en milieu neutre ou légèrement acide) l'absorption du tryptophane est au moins 4 fois supérieure à celle de la tyrosine. Le rendement quantique de ce dipeptide mesuré pour $\lambda_{exc} = 270 m\mu$ est de l'ordre de 0,1.

3. d- Conclusion : L'existence des transferts d'énergie

Phénylalanine ⟶ Tyrosine ⟶ Tryptophane et surtout Tyrosine ⟶ Tryptophane

ne trouvent pas de véritable confirmation (ou infirmation) dans les résultats obtenus sur ces dipeptides. Si l'existence d'une seule émission est en faveur de tels transferts, la forme de l'excitation et la valeur des rendements quantiques voisins de ceux obtenus avec une chaîne latérale non aromatique sont au contraire des arguments défavorables. Une étude des rendements en fonction de la longueur d'onde d'excitation (en particulier dans la zone 300-310mμ pour les peptides Tyr-Tryp), permettront sans doute d'apporter quelques précisions.

Il faut remarquer cependant que l'étude en fonction du pH de la Tryptophyl-Tyrosine met très nettement en évidence l'existence d'une interaction entre le groupement phénol et le noyau indolique.

Dans la zone de pH : 2-3, il y a diminution de la fluorescence due à R COO^- → R COOH. L'effet est moins important que pour le tryptophane seul étant donné la distance plus grande entre le cycle et le -COOH. En milieu alcalin, il y a une augmentation due à $-NH_3^+ \rightarrow NH_2$ dans la zone de pH 7-9 puis une diminution rapide dans la zone de pH 9-11 qui ne peut être attribuée qu'à la dissociation du -OH de la tyrosine. La fluorescence du peptide bien que provenant entièrement du tryptophane est sensible à l'ionisation de résidu tyrosyl. Il y a donc une interaction certaine entre les deux chromophores. Rappelons que dans ce cas, il y a un déplacement du spectre d'absorption de la tyrosine de plus de 200mμ vers les grandes longueurs d'onde. Certains auteurs (20) ont supposé l'existence dans ces conditions d'un transfert dans le sens indole → phénol.

4. Cas de polypeptides et des protéines

Depuis les travaux de TEALE et WEBER de grands efforts ont été faits pour tenter de relier les propriétés des résidus luminescents à la structure de ces polymères. Les problèmes qui se posent sont les suivants :

- interprétation de l'absence de fluorescence de la phénylalanine et surtout de la tyrosine dans les protéines contenant du tryptophane.

- détermination de l'influence de l'environnement sur l'émission des résidus aromatiques.

- démonstration de l'existence éventuelle de transferts d'énergie entre les résidus aromatiques. Ces différents problèmes sont en fait liés. L'étude des polypeptides ou des protéines ne contenant pas de tryptophane comme la ribonucléase n'a guère permis de progresser car elle soulève d'autres difficulté :

- valeur très basse des rendements quantiques,
- absence de proportionnalité de ces rendements quantiques au nombre de résidus luminescents,
- variation de l'émission en fonction de l'état physique du polymère.

Les résultats que nous avons obtenus sur les acides aminés et les peptides simples apportent des éléments nouveaux dans la discussion de ces différentes questions.

4.a. Il y a une influence importante de l'électronégativité des groupements latéraux sur la fluorescence des cycles. Au sein d'une protéine les groupements ionisables peuvent être ceux des acides aspartique et glutanique (-COO^-) et ceux de l'arginine, la lysine et de l'histidine (NH_3^+), les mêmes groupements peuvent se trouver en bout de chaîne. En fait l'influence de tous ces groupements diminue rapidement lorsque la longueur de la chaîne entre le cycle et le groupement électronégatif augmente et cette chaîne comporte toujours 5 carbones au moins.

Il se superpose à ce type d'interaction, l'influence (éventuellement de type électrostatique) de tout le milieu environnant qui dans le cas des protéines devient certainement la plus importante.

4.b. La liaison peptidique a un effet inhibiteur considérable (60% pour un -CONH) et dans ces conditions un tripeptide analogue à celui choisi par COWGILL est un meilleur élément de référence que l'amino-acide isolé.

4. c. Dans le cas de la tyrosine, les dernières publications faites sur le quenching de la fluorescence pour des protéines, des copolymères, ou la tyrosine seule (études en fonction du pH, de la température, du milieu ionique etc...) ne conduisent pas à des conclusions concordantes.

α) G. WEBER et K. ROSEN HECK (24), par l'étude de copolymère de tyrosine et d'acide glutamique ou de lysine, concluent à un quenching par transfert protonique du noyau phénol vers le $-COO^-$ ou le NH_2.

β) G. FASMAN, K. NORLAND et A. PESCE (25) concluent à un effet de quenching du groupement $-COO^-$ mais réfutent l'intervention d'une liaison du type $-COO^- \,..\, HO-R$.

ɣ) J. FEITELSON (12) propose un mécanisme de quenching pour les groupements carboxyl par un processus de transfert électronique intramoléculaire vers ce groupement.

Il est clair qu'un dénombrement plus complet des causes de quenching et que l'évaluation quantitative de ces effets permettront d'aller plus loin et relier avec précision la fluorescence des résidus aromatiques à la structure hélicoïdale ou désordonnée du polymère.

4. d. L'absence de fluorescence de tyrosine dans les protéines contenant du tryptophane a conduit de nombreux auteurs à proposer un transfert d'énergie tyrosine ⟶ tryptophane.

Rappelons que les conditions du transfert énoncées par FOERSTER (9) sont réalisées en ce qui concerne la distance. Cette distance R_o calculée par la formule suivante est toujours supérieure ou égale à la distance moyenne des chromophores dans ces produits.

$$R_o = \sqrt{\frac{1{,}69.10^{-33}}{n^2} \times \frac{\tau \int \tilde{\nu}}{\tilde{\nu}_o^2}}$$

τ = durée de vie de l'état excité.

$\tilde{\nu}_o$ = nombre d'onde moyen du max. de fluorescence.

$\int \tilde{\nu}$ = intégrale de recouvrement

n = indice du réfracteur

D'un autre côté des études plus quantitatives telles que celles de TEALE (95) conduisent à penser que ce transfert n'a lieu qu'avec une probabilité pratiquement négligeable. La mise au point de STREYER (96) conduisait à la situation suivante :

phénylalanine ⟶	Tyrosine	transfert
	Tryptophane	possible
Tyrosine ⟶	Tyrosine	
Tryptophane ⟶	Tryptophane	démontré
Tyrosine ⟶	Tryptophane	discutable

La situation actuelle peut donc se résumer ainsi :

) Les résultats de A. WADA et Y. UEND (26) sur des copolymères Tyr-Tryp sont en faveur du transfert Tyr → Tryp. La difficulté est de connaître la structure exacte du copolymère et d'obtenir des proportions relatives $\frac{\text{Tyr}}{\text{Tryp}}$ variables.

β) Les résultats sur les dipeptides vont à l'encontre de l'existence d'un transfert : la valeur des rendements quantiques pour les dipeptides aromatiques est du même ordre de grandeur que pour les peptides comportant une chaîne aliphatique.

Par contre l'impossibilité de détecter la fluorescence de la tyrosine lorsqu'il y a un reste tryptophane alors que l'on connait assez bien les causes du quenching reste un bon argument en faveur de œ transfert.

Il n'est donc pas possible de trancher à l'heure actuelle. Etant donné la position relative des pics d'absorption et d'émission (et les variations éventuelles en fonction du milieu), des expériences de fluorescence sensibilisée sur les amino-acides aromatiques se sont toujours montrées très délicates. Cependant une étude systématique et quantitative des mélanges d'acides aminés en solution et de copolymères de composition variable, de peptides (bien choisis) comportant un nombre de résidus variant de 2 à 5, une étude des variations de rendement en fonction de la longueur d'onde d'excitation et aussi l'amélioration du pouvoir séparateur des spectrophosphorimètres, doivent conduire à une meilleure appréciation de l'importance des mécanismes de transfert entre les résidus aromatiques au sein des protéines.

5. Conclusion générale

Cette brève étude de la fluorescence a permis de donner quelques propriétés spectroscopiques de l'état singulet des trois acides aminés aromatiques. Comme pour l'absorption, l'absence de structure des spectres n'a pas permis de préciser les interactions entre la structure électronique et la structure vibrationnelle de la molécule à l'état excité.

Par contre, cette étude constitue une approche d'un problème tout à fait fondamental : celui de l'influence des groupements latéraux sur le taux de désactivation non radiative d'une molécule fluorescente. Ce taux intervient directement dans la détermination du taux de transfert de l'énergie. La composition chimique des acides aminés montre que les interactions entre un groupement ionisé et un cycle dans l'état singulet excité ont lieu à une distance comprise entre 10 et 20 Å. On conçoit l'intérêt de ces résultats de fluorescence reportés dans le contexte macromoléculaire, pour la détermination des structures comportant des "résidus" aromatiques jouant le rôle de "détecteur" luminescents.

III. 2. B. PHOSPHORESCENCE

Dans les solvants habituels qui sont fluides à la température ordinaire, la désactivation radiative ne peut se faire qu'à partir de l'état excité dont la durée de vie est suffisamment courte (10^{-9} s) c'est-à-dire à partir de l'état singulet.

Dans un milieu suffisamment rigide, en réduisant la désactivation par collision, on peut obtenir une population suffisante de l'état triplet pour enregistrer une phosphorescence dont l'intensité est comparable à celle de la fluorescence.

1. Problème des solvants

Etant donné que la probabilité de transition directe T→S est faible, puisqu'il y a dans ce cas changement de multiplicité, la durée moyenne de vie

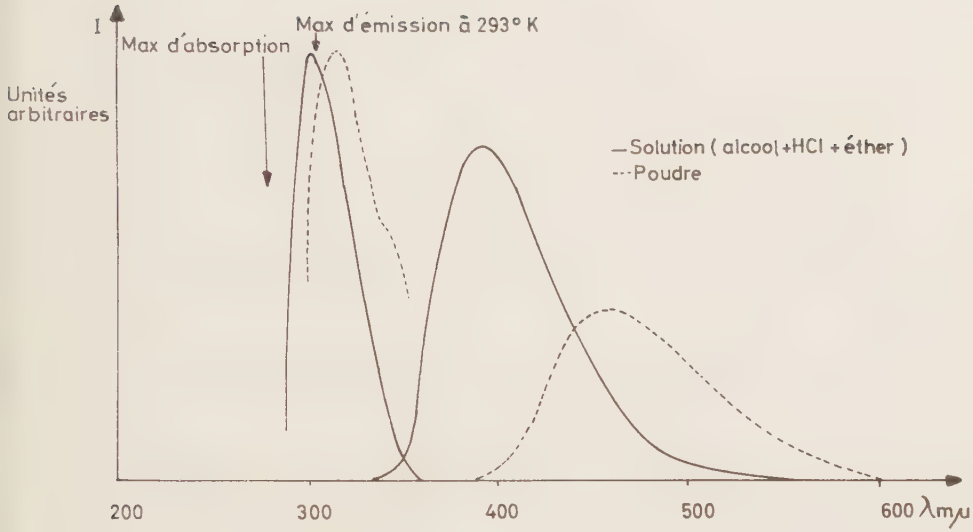


Fig. 18 Luminescence de la Tyrosine (77° K)

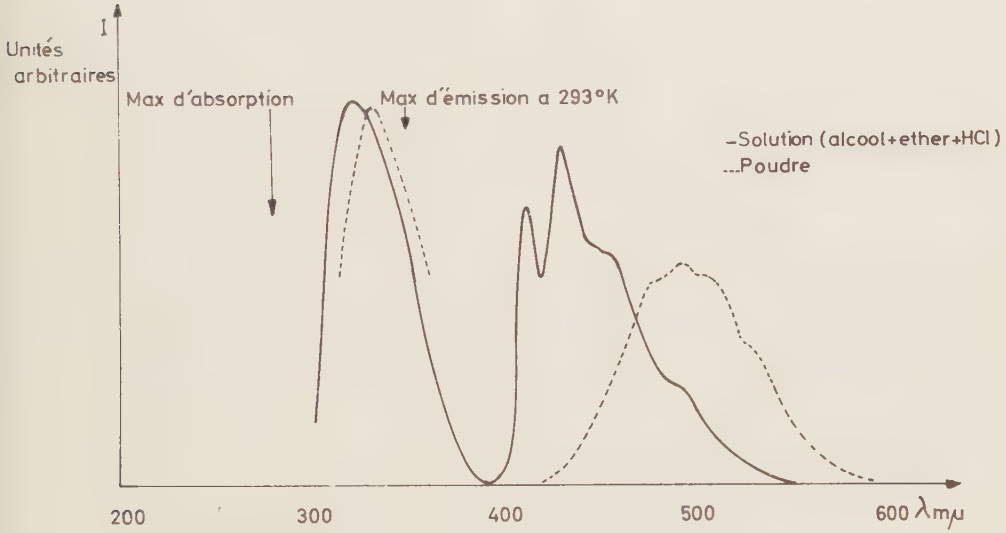


Fig. 19 Luminescence du Tryptophane (77°K)

de l'état triplet sera beaucoup plus longue et atteint couramment quelques secondes.

La population de l'état triplet dépend essentiellement de la viscosité du milieu et de la température. Ces deux facteurs sont en fait étroitement liés et il sera difficile de les distinguer avec les solvants habituels. En fait le problème sera d'obtenir un milieu parfaitement rigide et transparent. Des études de la phosphorescence de produits biologiques ont été faites dans la glace. Nous éliminerons ce solvant car à l'état solide il est cristallisé et la forme sous laquelle se trouve le soluté n'est pas connue.

Il est raisonnable d'admettre qu'une partie importante du soluté a précipité au moment de la cristallisation et se trouve sous forme de microcrsitaux.

C'est pourquoi nous utiliserons des solvants organiques congelant sans cristalliser et donnant à basse température des "verres" parfaitement transparents. En fait la structure de ces verres à basse température n'est pas davantage connue.

Mais on admet généralement que le soluté reste en solution et qu'il n'y a pas de début de précipitation ou même d'association pour des concentrations variant entre 10^{-5} et 10^{-2} mole/litre.

Les cinétiques de désactivation qui sont en général du premier ordre, alors qu'elles sont complexes pour l'état cristallin, les réactions photochimiques qui sont celles de la molécule isolée confirment qu'on peut considérer le verre comme une solution vraie.

A l'échelon moléculaire il faut cependant admettre que la structure de ce solvant vitreux n'est pas entièrement désordonnée puisque ses propriétés photochimiques ou radiochimiques dépendent du régime de refroidissement (refroidissement lent ou trempe). Il peut y avoir en outre des effets d'orientation au voisinage des parois. La molécule de soluté se présente plutôt comme une insertion dans un réseau présentant une organisation partielle. L'influence de l'environnement sur les propriétés spécifiques de l'état triplet de la molécule de soluté a été étudiée récemment par YAGER et ses collaborateurs (27).

Nous avons déjà donné la liste des solvants organiques qu'il est possible d'employer avec les acides aminés aromatiques. Pour les études à l'AMINCO nous utiliserons essentiellement l'EPA (+HC1) et un mélange alcool éthylique + éther (+ HC1). L'adjonction de HC1 qui permet d'augmenter considérablement la solubilité n'a pas d'effet qualitatif sur la phosphorescence. Pour des études quantitatives (mais on sait qu'elles sont particulièrement délicates pour la phosphorescence) ou des études photochimiques; il conviendrait d'en tenir compte.

Remarque

a) Pour éviter un effet éventuel de l'oxygène toutes les solutions ont été dégazées sous vide. Pour cela on accomplit un nombre suffisant de fois le cycle suivant : trempe à 77°K, réchauffement progressif, dégazage, trempe à 77°K.., etc. Ce procédé a l'inconvénient de modifier la concentration de la solution par sublimation et évaporation de solvants très volatils mais dans la majorité des cas il suffit d'avoir un ordre de grandeur des concentrations.

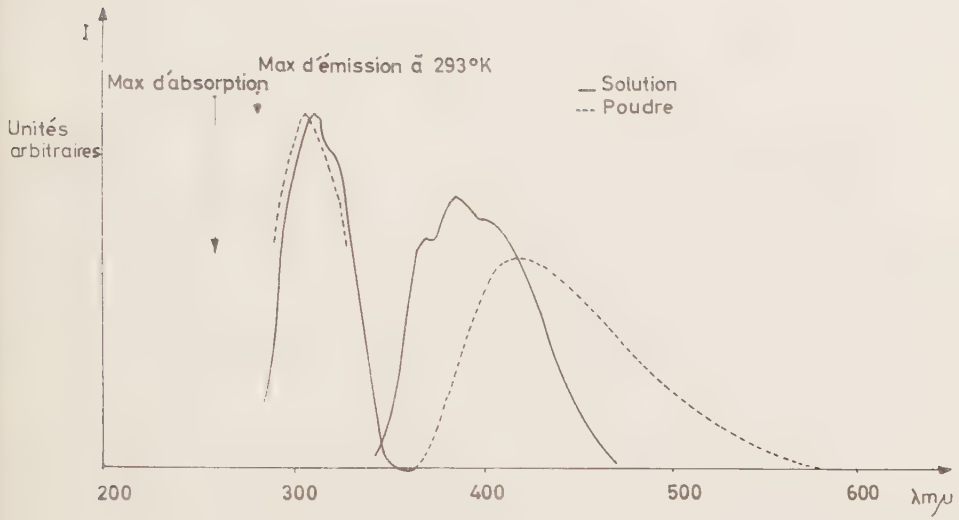


Fig. 20 Luminescence de la phénylalanine à 77°K

	Fluorescence λ max (mμ)		Phosphorescence λ max (mμ)	Durée de vie de la Phosphorescence
	293°K	77°K	77°K	77°K
Tyrosine				
Solution	305	305	395	2,7 s
Poudre		315	455	Cinétique complexe
Tryptophane				
Solution	350	320	430	6,5 s
Poudre		330	500	Cinétique complexe
Phénylalanine				
Solution	284	310	380	5,8 s
Poudre		305	420	Cinétique complexe

Caractéristiques des émissions des acides aminés

Fig. 21

b) Dans le cas du tryptophane en solution alcoolique, de grandes précautions ont été prises pour éviter la présence d'aldéhydes. On sait en effet que les composés indoliques donnent avec les aldéhydes des complexes facilement oxydables conduisant à des produits de dégradation colorés. Signalons pour terminer que nous avons utilisé des solvants qui sont déjà rigides à la température : matières plastiques, borates, acétate de cadmium. Des résultats partiels obtenus dans ce cas seront exposés par la suite.

2. Phosphorescence des acides aminés

a) En solution dans des verres organiques

A 77°K, la phénylalanine, la tyrosine, et le tryptophane excités au voisinage de leur maximum d'absorption émettent en plus de la fluorescence normale une phosphorescence caractéristique dont la durée de vie est de plusieurs secondes. Les courbes complètes des émissions à basse température sont données dans les figures 18, 19 et 20. Il s'agit de courbes non corrigées. Etant donné la courbe de sensibilité du photomultiplicateur 1P28 (max vers 350 mμ) les corrections à faire sont faibles pour les courbes de fluorescence mais deviennent importantes à partir de 450 mμ.

L'emploi du phosphoroscope permet de n'enregistrer que la phosphorescence. Les déclins de la phosphorescence sont enregistrés de deux façons : soit à l'oscilloscope, soit en utilisant un enregistreur potentiométrique dont la vitesse de découlement est connue. L'obturation, qui est faite manuellement, est suffisamment rapide et reproductible pour qu'il ne soit pas nécessaire d'éliminer plus de $\frac{1}{5}$ s en début de la courbe de décroissance. Pour l'enregistreur il faudra tenir compte de la constante de temps qui est de 0,6 s pour toute l'échelle, pour le G-14 VARIAN utilisé. Pour les trois composés les cinétiques de décroissance sont parfaitement exponentielles, et permettent la détermination des durées moyennes de vie qui sont portées sur le tableau. Nous avons porté sur la figure 22 un exemple de courbe de désactivation en coordonnées semi-logarithmiques. Il s'agit donc de l'émission Triplet→Singulet fondamental.

Au moins pour le tryptophane on obtient une courbe de phosphorescence bien structurée, contrairement à ce qui se passait pour la fluorescence.

En utilisant un pouvoir séparateur et une sensibilité optima, il est même possible de différencier les spectres de différents composés de la série indolique : indole, tryptamine, acide indole-acétique, tryptophane. Une extension et une amélioration de ce test est envisagée pour l'étude de la dégradation photolytique du tryptophane dans différents milieux et à différentes concentrations.

Il est possible de détecter la phosphorescence de ces acides aminés en utilisant des solutions aqueuses congelées. Mais il y a alors une perte de sensibilité considérable et les cinétiques de décroissance deviennent complexes traduisant le fait que le soluté est alors, au moins en partie, sous forme cristallisée.

Excitation du tryptophane dans la région de 350 mμ.

I. ISENBERG et A. SZENT. GYÖRGYI (2) ont montré la possibilité pour des solutions très concentrées de tryptophane ou pour des protéines contenant

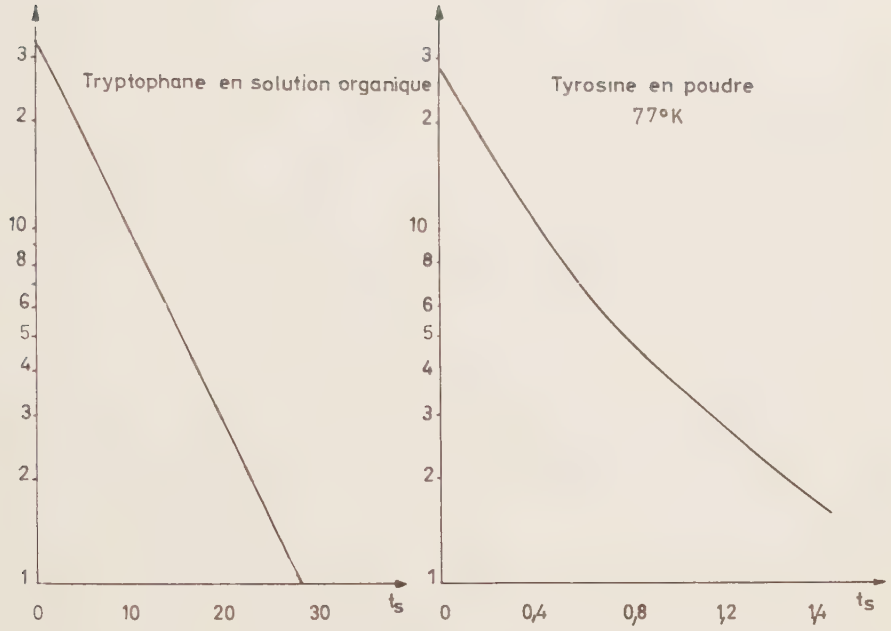


Fig. 22 Déclins de phosphorescence en coordonnées semi-logarithmiques.

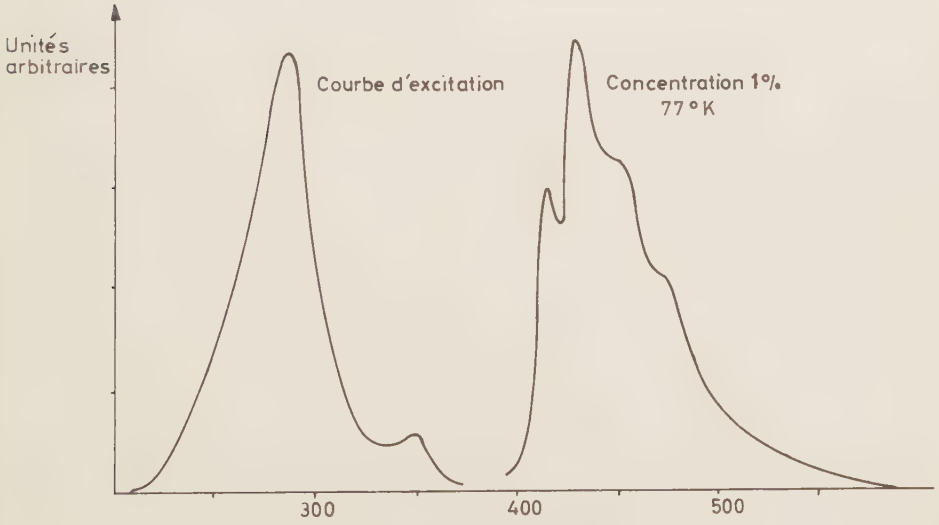


Fig. 23 Phosphorescence du tryptophane dans le P.V.A.

du tryptophane, d'exciter vers 350 mμ une faible luminescence dont le maximum se situe vers 470 mμ. Reprenant ces travaux, E. FUJIMORI (28) a montré que l'émission se composait en fait de deux bandes : l'une dont le maximum se trouve vers 450 mμ et correspondant à une émission de "courte-durée" et l'autre avec un maximum vers 500 mμ correspondant à une émission "longue-durée". Les premiers auteurs proposaient d'attribuer ce nouveau pic d'excitation à des agrégats qui se forment à concentration élevée ($\simeq 10^2$ M/litre). Nous avons repris ces résultats en utilisant cette fois des solvants organiques. Pour les solutions suffisamment concentrées ($\simeq 10^{-2}$ M/litre) dans le méthanol ou dans l'éthanol + HCl, on obtient en effet à 77°K un pic d'excitation dans la région 350-370 mμ. L'excitation dans ce domaine conduit notamment à une phosphorescence dont le spectre culmine dans la région 470-500 mμ et ne comporte aucune structure. Cette émission semble bien correspondre à "l'émission verte de longue durée" de FUJIMORI. A quoi correspond donc cette bande d'excitation dans la région 350-370 mμ?

a) Il ne peut s'agir de la transition directe S→T. Si cette transition est très sensible à l'effet oxygène, elle doit par contre avoir un maximum correspondant à la bande 0-0 de phosphorescence et ne doit pas conduire à 77°K à plusieurs types d'émission. Etant donné la position de la courbe d'émission de phosphorescence (λ max $\simeq$ 435 mμ) l'éventualité de la transition S→T est donc à rejeter.

b) Il est peu probable qu'il s'agisse de la luminescence de produits d'association. La formation de dimères stables dès la température ordinaire se traduirait par l'apparition d'une courbe d'absorption caractéristique avec un coefficient d'extinction élevé. Or la courbe d'absorption ne recèle pratiquement rien dans la région incriminée, pour des solutions concentrées de tryptophane.

Il faut cependant remarquer que la formation d'excimères ne doit pas être rejetée. On sait en effet que la formation de ces dimères à l'état excité se traduit par l'apparition d'une fluorescence déplacée vers les grandes longueurs d'onde sans qu'il y ait modification de la courbe d'absorption. Mais la position du pic d'excitation qui se trouve en dehors de la courbe d'absorption et l'existence de deux types d'émissions ne correspondent guère aux propriétés habituelles des excimères. Notons cependant que pour la polytyrosine en solution dans la DMF et à la température ordinaire nous avons obtenu des résultats qui rappellent au moins en partie les précédents : existence d'un pic d'excitation en dehors de la courbe d'absorption (vers 310 mμ) qui donne une nouvelle bande de fluorescence déplacée vers les grandes longueurs d'onde (λ max = 400 mμ). Pour le polytryptophane les résultats sont moins nets. De toute façon ces résultats n'ont pas reçu d'interprétation pour le moment. Mais S. S. LEMRER et G. D. FASMAN (29) interprètent des résultats semblables par la formation d'excimères.

c) Quelques auteurs ont proposé l'existence de transition $n \longrightarrow \pi^*$. A cette longueur d'onde, il ne peut s'agir d'une transition intéressant le C = O du groupement carboxy (et elle devrait alors être présente dans tous les acides aminés) et la formule du tryptophane ne permet pas d'envisager d'autre transition de ce type.

d) Il ne faut donc pas exclure la présence d'impuretés ou plus exactement de produits de dégradation. On connait en effet la très grande sensibilité

du tryptophane et plus généralement du noyau indolique à l'oxydation tout particulièrement en présence d'aldéhyde ou en milieux très fortement acide. Etant donné les conditions de préparation et de manipulation du tryptophane ou des protéines contenant cet amino-acide, les intensités lumineuses utilisées en phosphorimétrie, il peut se former des quantités suffisantes de produits de dégradation pour donner lieu à une émission, bien qu'on n'observe pas d'absorption appréciable. La position des courbes d'émission laisse penser qu'il peut y avoir plusieurs dérivés. Rappelons que GROSSWEINER et ses collaborateurs (30) ont obtenu au cours de la dégradation en milieu fortement acide des dérivés pouvant donner lieu à de telles émissions.

Le tryptophane dispersé dans l'alcool polyvinylique donne également lieu à une excitation au voisinage de 350 mμ, mais on ne peut exclure dans ce cas la formation d'associations. Par contre à la température ordinaire, le tryptophane inclus dans un cristal d'acétate de Cadmium donne lieu au même phénomène. Et dans ce cas il faut exclure toute agglomération possible. A 77°K l'émission de phosphorescence normale devient la plus importante.

Nous concluons donc en attribuant l'excitation à 350 mμ et l'émission correspondante à des dérivés indoliques formés soit au cours de la préparation soit au cours de la manipulation ultérieure du composé.

Luminescence de très longue durée.

Pour les solutions aqueuses cristallisées et pour les poudres, l'irradiation à 77°K provoque l'apparition d'une émission de très longue durée en plus de la fluorescence et de la phosphorescence normales que nous avons précédemment étudiées. On obtient les mêmes résultats avec les protéines contenant des acides aminés aromatiques. Les caractéristiques spectrales de cette troisième émission sont voisines de celles de la phosphorescence "normale". Ce qui donne à penser que l'émission se fait à partir du même niveau triplet moléculaire. Nous avons recherché l'existence d'une telle émission des verres organiques. Pour les trois acides aminés aromatiques nous n'avons pas enregistré en utilisant la sensibilité maximum du spectrophosphorimètre d'émission de très longue durée. Il convient cependant de remarquer que dans ces conditions les intensités d'irradiation en lumière monochromatique sont relativement faibles et que la détection se fait également à travers un monochromateur. Comme nous le verrons au cours d'une prochaine discussion, il est possible que le nombre de "centres" créés et qui peuvent donner lieu à un phénomène de recombinaison radiative, soit trop faible pour pouvoir donner lieu à une émission détectable dans les conditions expérimentales réalisées.

b) Phosphorescence des acides aminés en phase solide.

Le relevé des spectres de phosphorescence (et aussi de fluorescence) peut être également fait sur les poudres microcristallines excitées à 77°K. Les échantillons sont dégazés et scellés sous vide dans des tubes de quartz de diamètre intérieur $\simeq$ 3 mm. Les phénomènes de réflexion et de diffusion sont particulièrement gênants au moins en ce qui concerne la fluorescence.

Si les spectres de fluorescence sont peu modifiés, les spectres de phosphorescence diffèrent notablement des spectres obtenus dans le cas des verres. Nous constatons :

- un déplacement important des max. d'émission vers les grandes longueurs d'onde ($\simeq 30$ mμ)

- une diminution importante de l'intensité de phosphorescence par rapport à la fluorescence

- une diminution importante de la durée moyenne de vie

- l'apparition de cinétiques de décroissances complexes.

Les données numériques sont portées dans le tableau de la figure 21. Après l'extinction de la phosphorescence normale il persiste une émission de très longue durée (elle peut durer plusieurs minutes pour des excitations d'une dizaine de secondes) dont la nature sera reliée à l'émission de thermo-luminescence obtenue par le réchauffement d'acides aminés solides préalablement irradiés.

Remarque

Les résultats obtenus sur des solutions aqueuses cristallisées sont voisins des résultats obtenus sur les poudres ce qui nous conduit à penser qu'il s'agit de milieux hétérogènes. Nous ne reviendrons plus sur ce type de résultats.

Discussion

Nos résultats sont en bon accord avec ceux de J. NAG-CHAUDHURI et L. AUGENSTEIN (31) publiés récemment. Ces mêmes auteurs ont même tenté d'évaluer le rapport F/P pour les verres et pour les poudres; mais au moins dans le cas des poudres les mesures quantitatives sont très peu reproductibles et il conviendra d'être prudent sur les combinaisons à tirer.

Les cinétiques de désactivation de la phosphorescence sont complexes. Nous avons figuré en 22 à l'aide de coordonnées semi-logarithmiques la désactivation de la tyrosine dont l'allure est tout à fait caractéristique. En accord avec AUGENSTEIN on peut représenter ces cinétiques par une fonction du type suivant :

$$I_C = A_1 e^{-\alpha 1 t} + A_2 e^{-\alpha 2 t}$$

On obtient de cette façon deux constantes de temps pour la tyrosine : 0,3 s et 1,2 s pour un temps moyen de décroissance de 0,4 à 0,5 s. Cette hypothèse suppose l'existence de deux sites au sein de micro. cristaux pour les centres émetteurs. Etant donné la valeur du rapport surface/volume pour de telles poudres il peut effectivement exister plusieurs types d'environnement : l'un correspondant à des centres purement superficiels, l'autre correspondant à des centres répartis à l'intérieur du cristal moléculaire. La pénétration de la lumière dans un cristal pur d'acide aminé est de l'ordre de quelques microns dans le cas de la tyrosine. Elle est donc suffisante pour une participation effective de la structure cristalline à l'émission de phosphorescence. Il ne faut cependant pas exclure la possibilité de mécanismes bimoléculaires (ou même plus complexes) pour rendre compte de l'effet d'extinction auquel il faut s'attendre en phase rigide cristalline.

En fait, ces résultats montrent clairement la nécessité de travailler non pas sur des poudres mais plutôt sur des monocristaux de très haute pureté. En effet l'obtention de monocristaux organiques de très haute pureté (fusion de zone) conduit actuellement à une révision importante des interprétations de la luminescence cristalline puisqu'on obtient dans ce cas une diminution presque totale de la phosphorescence. Une installation de préparation de monocristaux à partir des solutions saturées est en voie d'achèvement au laboratoire de Physique de l'ENS de St-Cloud et nous espérons ainsi pouvoir aborder de façon plus rationnelle l'étude de la luminescence cristalline des composés biologiques.

c) Phosphorescence des acides aminés dispersés dans des milieux rigides à la température ordinaire.

Les solvants organiques ont l'inconvénient de n'avoir une viscosité suffisante que dans un intervalle étroit de température au-dessus de 70°K. Il est difficile dans ces conditions d'étudier indépendamment les effets de temperature, de diffusion de l'oxygène, de structure de la "cage" de solvant. Pour la RPE il se pose en outre le problème d'une manipulation commode des échantillons. C'est pourquoi nous avons recherché des milieux rigides dès la température ordinaire et dans lesquels on puisse solubiliser ces composés. Le plus connu est l'acide borique qui par pyrolyse vers 200°C donne un verre transparent, mais très hygroscopique. La difficulté est d'éviter l'oxydation ou la destruction du "soluté".

Nous nous sommes orientés dans une voie différente mais rappelons cependant que M. SANTUS vient de mettre au point au laboratoire de Biophysique une méthode permettant de tels verres sans risque d'oxydation.

Nous avons donc étudié la possibilité d'employer des matériaux tels que : les matières plastiques et les cristaux minéraux.

α Phosphorescence de molécules dispersées dans des plastiques

A la suite des études menées en collaboration avec N. TRUBLIN (33), nous avons sélectionné deux polymères : le polyméthylmétacrylate (PMMA) pour les carbures aromatiques et l'alcool polyvinylique (APV) pour les composés d'intérêt biologique. Nous nous sommes en effet servis de composés tels que le naphtalène, le phénanthrène etc ... dont les caractéristiques en luminescence sont bien connues pour tester la méthode. Les échantillons sont préparés de deux façons :

- par polymérisation thermique, sans addition de catalyseur, pour le PMMA, le soluté étant initialement dissout dans le monomère. L'utilisation de peroxyde de benzoyle pour la préparation de tels échantillons est en effet à proscrire car il conduit à une émission parasite particulièrement gênante aux faibles concentrations. Les échantillons parfaitement dégazés au départ, sont polymérisés dans des tubes de verres de 3 mm de diamètre intérieur. En cassant le verre on obtient un cylindre homogène et parfaitement transparent dont l'utilisation est particulièrement commode en RPE. La masse moléculaire moyenne mesurée par diffusion de la lumière est de l'ordre de 245.000. La transparence du support est suffisante jusqu'à 260 mμ. Les concentrations du soluté sont données par rapport au monomère; dans lequel la mise en solution a été faite.

Durée de vie de la phosphorescence dans le PMMA		
	293° K	77 °K
naphtaléne	1,5 s	2,4 s
phenanthrène	1,6 s	3,4 s
chryséne	1,2s	2,4s
coronéne	6,8s	9,4s

Tableau 1

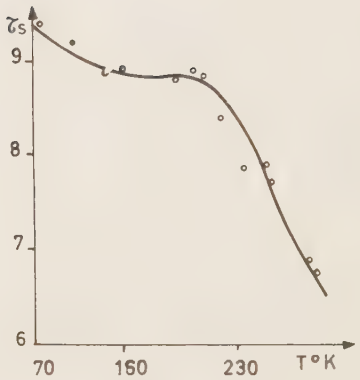
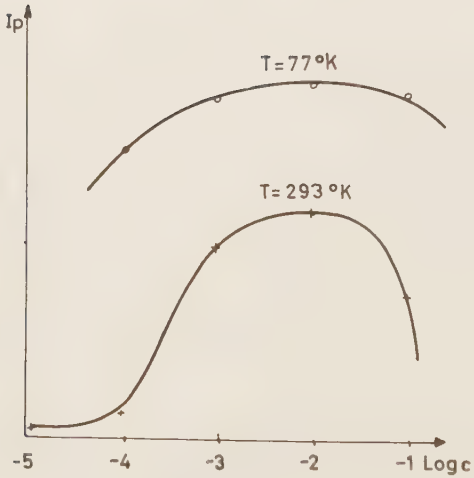
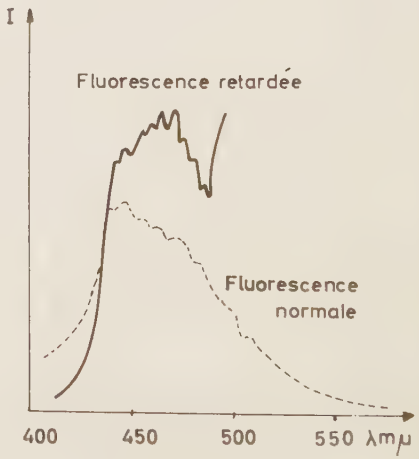


Fig 1

Fig. 24



Variation de l'intensité de phosphorescence en fonction de la concentration pour le phénanthrène dans le P.MMA.



Fluorescence retardée du coronène dans le P.M.MA. à 293°K

Fig. 25

- par évaporation d'un solvant connu, qui est l'eau pour l'APV. On prépare de cette façon des films minces (2 à 3/10 de mm d'épaisseur) parfaitement transparents. Un dégazage sous vide élevé à la température ordinaire ne modifie plus les propriétés du film préparé par une évaporation qui est d'abord très lente (2 jours).

Nous avons porté sur les figures 24 et 25 quelques uns des résultats obtenus avec les carbures aromatiques. Les points suivants sont les plus intéressants :

- les durées de vie de la phosphorescence à 77°K dans le PMMA sont pratiquement identiques à celles obtenues avec l'EPA à cette même température.

- l'étude de la durée de vie en fonction de la température montre une diminution de τ qui est plus nette dans la zone 210-250°K et qui correspond d'ailleurs à une chute brutale de l'intensité de phosphorescence. Mais il n'y a rien d'analogue à la variation brutale de τ pour le naphtalène deutéré inclus dans le durène et qui correspond donc certainement à un changement de phase du milieu solvant.

- à une température donnée, la durée de vie varie très peu en fonction de la concentration. Par contre l'intensité de phosphorescence passe par un maximum particulièrement net à 293°K pour des concentrations de l'ordre de 10^{-2} M/litre. Une extinction par effet de concentration ne peut donc expliquer convenablement ce résultat, il est préférable d'admettre la formation d'agrégats non phosphorescents pour des concentrations supérieures à 10^{-2} M/litre.

- Pour des échantillons laissés à l'air, on obtient une extinction progressive de la phosphorescence qui est due à la diffusion de l'oxygène dans les plastiques. Il est possible de régénérer l'échantillon en le plaçant dans une atmosphère d'hydrogène pendant quelques heures.

En ce qui concerne les molécules d'intérêt biologique nous avons étudié en plus des acides aminés, une base purique : l'adénine et une protéine globulaire : l'albumine de blanc d'oeuf. Mais les concentrations obtenues sont plus faibles et seul le tryptophane permet pour le moment de travailler à la température ordinaire. Les résultats obtenus ne diffèrent pas notablement de ceux obtenus avec les carbures aromatiques (figure 23).

Mais notre attention se porte plus spécialement sur la préparation d'échantillons orientés par étirement. L'alignement des macromolécules entraîne une orientation au moins partielle des molécules planes de soluté, comme celles du tryptophane.

Conclusion

Cette étude préliminaire que nous avons résumée très brièvement est donc appelée à des développements très fructueux. Les possibilités les plus intéressantes sont les suivantes :

- manipulation commode des échantillons qui sera très appréciée en RPE,

- étude de l'effet de température jusqu'à + 100°C,

- étude de l'influence du milieu : structure, liaisons secondaires, oxygène, radicaux, sur la désactivation radiative des molécules.

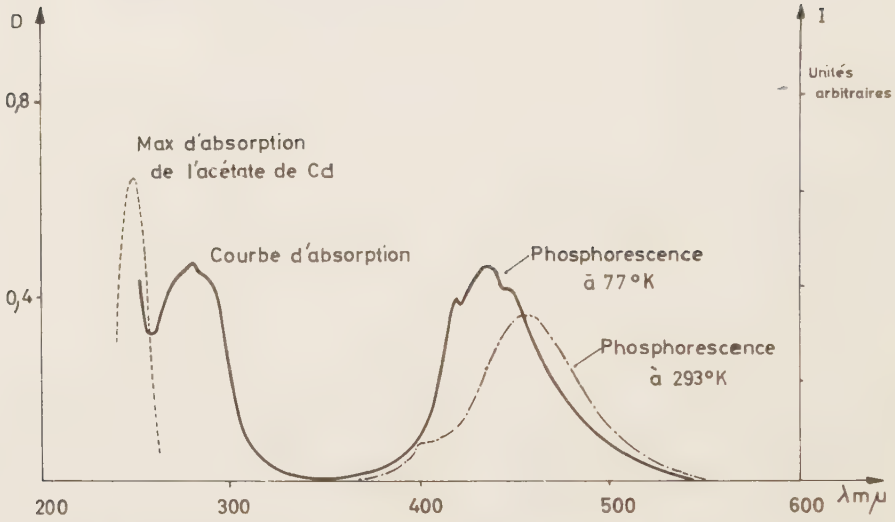
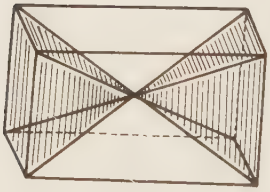


Fig. 26 Propriètés du Tryptophane inclus dans l'acétate de Cd



Disposition du Tryptophane
inclus dans un cristal de $Cd(CH_3coo)_2$
Fig. 27

Les études de RPE montrent en particulier qu'il y a production de radicaux induits dans le polymère; Ces centres paramagnétiques pouvant influer sur le couplage spin-orbite de la molécule émettrice.

- obtention d'échantillons partiellement orientés et études en lumière polarisée

- études photochimiques sans variations importantes de la viscosité.

β Phosphorescence d'inclusions dans l'acétate de cadmium.

L'inclusion d'une molécule dans un cristal optiquement transparent permet d'atteindre des propriétés spécifiquement moléculaires par des études en lumière polarisée ou par R.P.E. (constantes du splitting en champ nul de l'état triplet). Pratiquement en dehors du cas bien connu du naphtalène dans le durène il n'y a que très peu d'exemples où l'on a su fabriquer des cristaux mixtes pour des études de luminescence. Reprenant l'idée très ancienne (35) d'absorber des colorants sur des cristaux minéraux, nous avons été conduits à la suite des résultats de HARTMANN (36) à essayer l'inclusion des acides aminés dans l'acétate de cadmium. Si la cristallisation est bien menée, on peut obtenir de gros monocristaux non maclés et bien transparents. Ces cristaux ne sont pas hygroscopiques mais l'effet de l'oxygène rend nécessaire leur conservation en atmosphère contrôlée (N_2, H_2.). Les trois acides aminés permettent la préparation de tels monocristaux, le tryptophane étant le plus commode à inclure et à étudier.

Nous n'avons pas, pour le moment, de méthode simple pour le polissage de ces cristaux. Néanmoins de petits monocristaux de 2 ou 3 mm d'épaisseur ou des lames obtenues par clivage ont pu être utilisées pour les études préliminaires.

- L'acétate de cadmium qui présente un pic étroit d'absorption caractéristique du tryptophane ou de la tyrosine (figure 26).

- Les concentrations moyennes obtenues sont équivalentes à celles de solutions organiques de concentration 10^{-4} à 10^{-6} mole/litre. Pour le tryptophane, on obtient une absorption faible mais non nulle au-delà de 310 mμ analogue à l'absorption culminant vers 320 mμ des verres d'acide borique contenant du tryptophane et préalablement irradiés.

- Les monocristaux excités par l'u.v. à la température ordinaire, et à 77°K émettent une phosphorescence qui permet de préciser la répartition de l'inclusion au sein du monocristal. Cd $(CH_3COO)_2$ cristallise dans le système monoclinique prismatique. Pour le tryptophane, on obtient une émission suivant deux pyramides opposées par le sommet qui correspondent aux plans (100). Selon le schéma de la figure 27. Pour la tyrosine il n'y a pas d'émission localisée aussi nettement détectable que dans le cas précédent. Des mesures d'absorption seront nécessaires pour détecter une éventuelle répartition préférentielle suivant les plans (100) ou les plans perpendiculaires (010). Ces conclusions sont valables pour la phénylalanine.

- Les spectres d'émission obtenus avec le tryptophane sont complexes. A la température ordinaire la courbe de phosphorescence qui culmine vers 460 mμ n'est pas résolue et n'est pas celle du tryptophane. La courbe d'excitation correspondante comporte deux maxima; l'un vers 260 mμ, l'autre vers 350 mμ. Si

on abaisse la température à 77°K on obtient la courbe caractéristique de l'émission du tryptophane avec un pic d'excitation à 280 mμ .

Il est difficile d'envisager la formation d'associations pour les molécules de tryptophane réparties au sein du monocristal. On est donc réduit à attribuer l'excitation à 350mμ et l'émission correspondante à un produit dérivé du tryptophane formé au cours de la préparation du cristal et dont la molécule a des caractéristiques stériques voisines de celles de l'acide aminé. La variation de l'intensité de phosphorescence de ce composé en fonction de la température serait cependant anormale puisqu'à 77°K on obtient seulement la phosphorescence habituelle du tryptophane. C'est pourquoi il convient de souligner les anomalies de l'effet oxygène. Comme pour les plastiques, il y a une diffusion de l'oxygène au sein du cristal qui se traduit par une extinction progressive de la phosphorescence à la température ordinaire. On peut régénérer l'échantillon en le plaçant en atmosphère d'hydrogène. Mais comme pour les plastiques on obtient un effet d'extinction variable avec la température. En dessous de 150°K l'effet d'extinction diminue rapidement et on retrouve la phosphorescence intense de l'acide aminé. Il ne faut donc pas exclure la formation à température ordinaire d'un produit d'association avec l'oxygène qui serait responsable d'une émission excitée à 350 mμ particulièrement sensible à l'effet de température.

En ce qui concerne la structure cristalline de ces systèmes nous possédons jusqu'ici très peu de renseignements. Il ne s'agit pas de véritables cristaux mixtes. Il est cependant nécessaire, pour obtenir l'inclusion, qu'il y ait isomorphisme au moins partiel entre les molécules, analogie entre les réseaux cristallins et analogie entre les forces de cohésion.

L'isatine qui comporte un noyau indolique donne des cristaux mixtes et HARTMANN (36) a montré qu'il y avait une correspondance entre la géométrie de la molécule et celle du réseau cristallin de Pb $(CH_3COO)_2$ qui peut être utilisé au lieu de Cd $(CH_3COO)_2$.

Conclusion

Comme pour les plastiques, cette étude préliminaire ouvre des perspectives intéressantes :

a) Possibilité d'obtenir des molécules parfaitement orientées dans un milieu transparent jusqu'à 265mμ, possibilité intéressante pour les études en lumière polarisée.

On sait d'autre part que l'utilisation des solvants cristallisés (le cyclohexane pour les carbures aromatiques) conduit à une résolution très supérieure à celle obtenue avec des solvants vitreux. Les performances limitées de l'AMINCO dans ce domaine nous conduisant à l'utilisation d'un spectrographe à prismes pour l'enregistrement de la phosphorescence dans ces cristaux.

b) Possibilité d'étudier les effets de température et d'extinction de l'oxygène dans un milieu rigide.

c) Possibilité d'études photochimiques : en particulier de l'étude de la photoéjection : $A + h\nu \longrightarrow A^+ + \bar{e}$.

On sait que les molécules 0_2 et aussi les ions Cd^{++} sont d'excellents accepteurs d'électrons.

La grande variété de molécules (nous avons obtenu de très beaux monocristaux avec le naphtol β , certains colorants, etc...) qu'il est en définitive possible d'inclure dans des supports de ce type permettra de fructueuses comparaisons.

d) Il est bien évident que cette méthode peut également se montrer utile dans des études purement cristallographiques ou pour l'étude de la diffusion de l'oxygène dans les cristaux minéraux.

3. Phosphorescence des peptides et des protéines

Les études quantitatives de phosphorescence sont peu avancées aussi bien dans le cas des solides (monocristaux ou poudres microcristallines) que des solutions fluides ou rigides. Dans le cas des verres organiques, le manque de reproductibilité provient des faits suivants :

- obligation de travailler à basse température,
- dégazage des solutions qui conduit à des variations de la concentration,
- solubilités faibles des composés biologiques dans les solvants organiques,
- variation des propriétés des verres en fonction des conditions expérimentales (retrait, craquage, organisation partielle),
- difficulté d'éliminer certaines impuretés luminescentes.

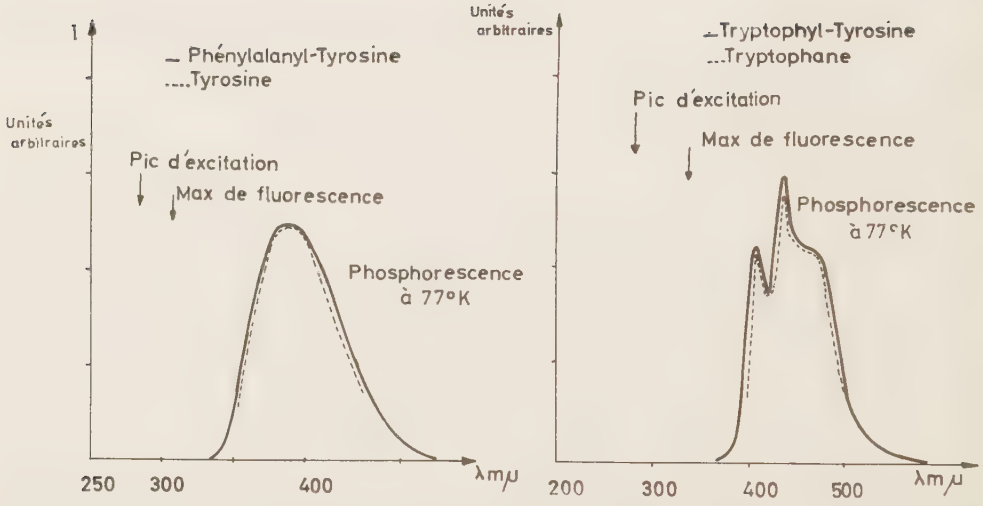
Bien qu'ayant entrepris une expérimentation pour améliorer la méthode (choix des solvants, forme spéciale des cellules, etc...) nous ne donnerons ici que des résultats qualitatifs. L'intérêt de ces résultats est qu'ils nous serviront de base pour l'étude en RPE.

Pour résumer les résultats obtenus, nous donnerons les règles suivantes, qui sont d'ailleurs très proches de celles énoncées pour la fluorescence.

a) Pour les dipeptides aromatiques du type Phe-Tyr ou Phe-Tryp on n'enregistre que l'émission de la tyrosine ou du tryptophane. Le spectre d'excitation ne permet pas d'enregistrer une contribution de la phénylalanine.

b) Pour les dipeptides du type : Tyr-Tryp on n'enregistre que l'émission du tryptophane (figure 28).

Ce résultat est en faveur d'un transfert d'énergie dans le sens TYROSINE $\longrightarrow$ TRYPTOPHANE du type TRIPLET $\longrightarrow$ TRIPLET. En effet, si la probabilité de passage $S_1^* \rightarrow T_1^*$ (intersystem crossing) pour la tyrosine peut varier avec la nature des liaisons, la nature des groupements latéraux et d'une façon plus générale avec l'environnement, les facteurs essentiels qui interviennent dans la modification du couplage spin-orbite sont les éléments paramagnétiques. Le greffage d'un noyau indolique ne doit pas conduire, à priori, à une annulation pure et simple de la transition $S_1^* \longrightarrow T_1^*$. Les règles de désactivation non radiative à partir de l'état triplet sont différentes de celles de la fluorescence puisque la molécule à l'état triplet représente en fait une nouvelle espèce dont les distances internucléaires et la structure électronique ont été totalement modifiées. Mais là aussi, il est difficile de concevoir qu'à partir d'un état T_1 suffisamment peuplé on n'obtienne aucune émission. L'absence complète de phosphorescence est donc en faveur d'un transfert efficace TRIPLET $\rightarrow$ TRIPLET dans le sens indiqué. La position des courbes d'absorption rend impossible toute expérience de phosphorescence sensibilisée. Deux résultats expérimentaux viennent cependant renforcer notre hypothèse.



Phosphorescence des dipeptides en solution organique

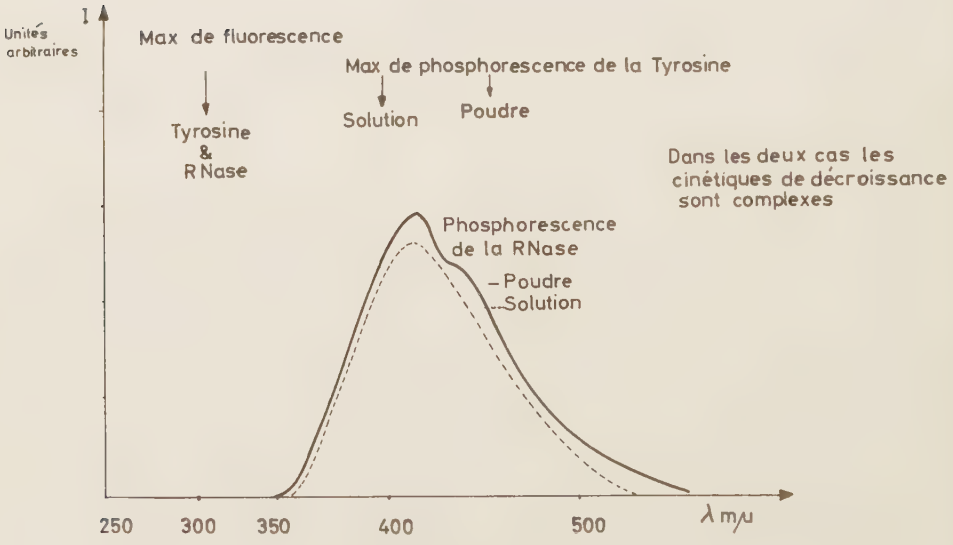


Fig. 28 Emission de la RNase

Transfert d'énergie acétophénone ⟶ tryptophane

En solution organique à 77°K on obtient un transfert triplet→triplet démontré d'une façon univoque :

L'excitation de l'acétophénone dans sa bande d'absorption (λ max ≃ 3600Å) conduit à une émission de phosphorescence qui est celle du tryptophane. La comparaison des positions des niveaux énergétiques permet de voir qu'un transfert identique est possible entre la tyrosine et le tryptophane :

	T_1		T_1
Acétophénone	25 750 cm^{-1}	Tryptophane	23 200 cm^{-1}
Tyrosine	25 300 cm^{-1}	"	"

La séparation des niveaux triplets est de l'ordre de celle rencontrée dans tous les couples classiques accepteur-donneur : qui est voisine de 2.000 cm^{-1}.

Remarque. Pour la phénylalanine le triplet se situe à 26.300 cm^{-1}. L'écart avec la tyrosine ≃ 1.000 cm^{-1} est à la limite des conditions à réaliser pour le transfert mais pour le tryptophane il n'y a aucune difficulté.

Etude des mélanges tyrosine-tryptophane

L'étude de ces mélanges donne des résultats qui sont peu reproductibles. Ceci provient du fait que pour des concentrations allant de 10^{-4} à 10^{-2} M/Litre les conditions de milieu (qui déterminent la distance et l'orientation des molécules : accepteur-donneur, sont peu reproductibles lorsqu'on refroidit à 77°K l'acétophénone donne par contre avec le tryptophane une association dès la température ordinaire). La moyenne des résultats obtenus et que nous retrouverons en RPE est la suivante : l'excitation à 280mμ du mélange équimoléculaire, compte tenu des coefficients d'extinction moléculaire respectif et des intensités de phosphorescence, conduit à une diminution de l'ordre de 30% de l'intensité de phosphorescence de la tyrosine, donc à un transfert Tyrosine ⟶Tryptophane.

c) Polypeptides. Ils sont encore suffisamment solubles dans les solvants organiques (éthanol, DMF) pour qu'on puisse enregistrer leur phosphorescence. Pour les trois acides aminés l'émission de phosphorescence des polypeptides correspondant - (η = 20 à 30) se caractérise :

α) par une diminution importante de l'intensité relative de phosphorescence,
β) par une durée de vie faible : 0,2 s pour le polytryptophane,
γ) par des déplacements des max. d'émission par rapport au monomère ou au dimère.

Exemples

Polytryptophane = λ_{max} ≃ 410 mμ (monomère λ_{max} = 430 mμ)

Polyphénylalanine = λ_{max} ≃ 425 mμ (monomère λ_{max} = 380 mμ)

Sous leur forme hélicoïdale, les polypeptides constituent un bon exemple de "cristal linéaire", c'est-à-dire de la répétition dans un arrangement parfaitement régulier et suivant une seule dimension d'un motif simple, qui est ici de nature aromatique. Les études d'absorption ne permettent guère d'envisager une interaction importante entre les chromophores de la chaîne. L'étude des

propriétés intrinsèques du triplet suppose que l'on connaisse de façon parfaite celles du singulet puisqu'en fait l'un résulte de la désactivation partielle de l'autre. Les résultats obtenus en fluorescence constituent une première approche de ce problème. Le problème qui reste à résoudre est celui des propriétés du squelette peptidique dans la conception excitonique du transfert de l'énergie (modèle de DAVYDOV) et celui de ses interactions avec les chromophores aromatiques.

d) Protéines. Il n'est pas dans notre but de faire une étude systématique des protéines en fonction de leur composition en acides aminés aromatiques. En dehors du fait que de nombreux auteurs ont déjà abordé le problème, une telle étude nécessite pour être fructueuse un support très complet pour la préparation, les études morphologiques et chimiques des composés. Il s'agit de replacer les acides aminés étudiés dans leur contexte biologique en précisant certaines propriétés spécifiques. C'est pourquoi nous nous sommes limités à trois espèces de protéines :

- les albumines (de blanc d'oeuf, bovine, sérum albumine humaine)
- la trypsine (2 fois cristallisée - Mann Research)
- la Ribonucléase (Type : salt-and protease-free Sigma)

Les résidus aromatiques sont distribués dans les rapports suivants :

	phénylalanine	Tyrosine	Tryptophane
Sérumalbumine	33	17	1
Trypsine	4	9	4
Ribonucléase	3	6	0

KATZ (37) préconise pour les études à basse température l'emploi d'un solvant universel qui est l'acide fluorhydrique. Nous avons relevé des spectres de phosphorescence des trois protéines dans ce solvant. Les spectres obtenus sont très nettement modifiés par rapport à ceux de la poudre ou d'autres solutions organiques : absence de structure et déplacement des maxima.

D'autres solvants organiques peuvent être utilisés : mélanges d'amines et d'acide trifluoacétique (38), mélange eau-glucose. Nous avons obtenu de bons résultats avec des mélanges eau-éthanol-HCl en proportions variables suivant le cas (en moyenne, 1 volume d'eau puis 3 volumes d'alcool). Les spectres obtenus sont portés dans la Fig. 40. Les résultats essentiels, obtenus bien entendu à 77°K, sont les suivants :

a) Il n'y a pas différence spectrale importante entre l'émission des poudres microcristallines et celle des solutions. En fait les émetteurs privilégiés sont les résidus aromatiques, plus spécialement la tyrosine et le tryptophane qui sont "dilués" dans un support aliphatique. L'état physique de ce support peut donc modifier la forme des surfaces d'énergie potentielle de ces chromophores sans modifier sensiblement leur position énergétique. Mais comme nous allons le voir, il doit surtout intervenir pour modifier les rapports des chromophores entre eux (distance et position).

b) Pour la Trypsine et l'Albumine bovine que nous prendrons comme exemple l'émission correspond à celle du tryptophane. Les maxima d'émission en particulier pour la Trypsine en poudre correspondent à ceux du Tryptophane en solution.

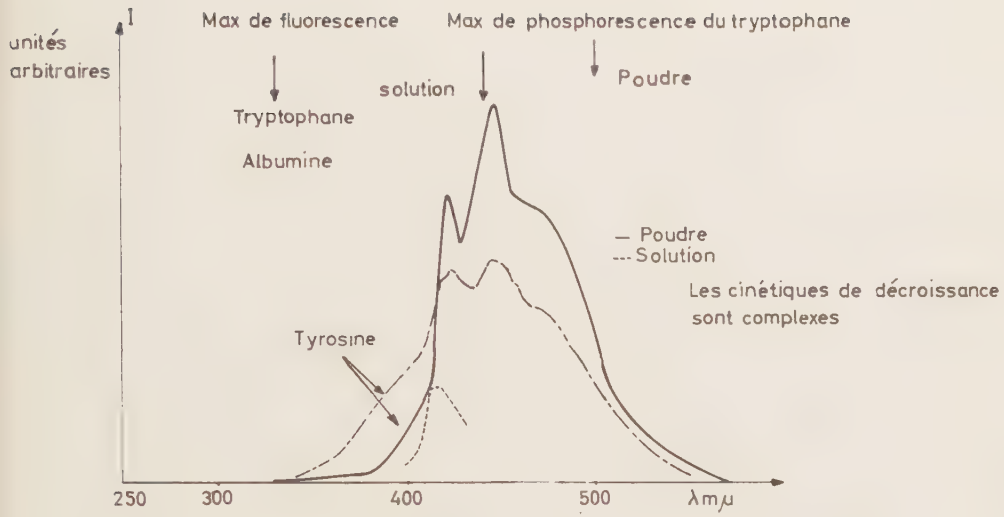


Fig. 29 Emission de l'Albumine bovine

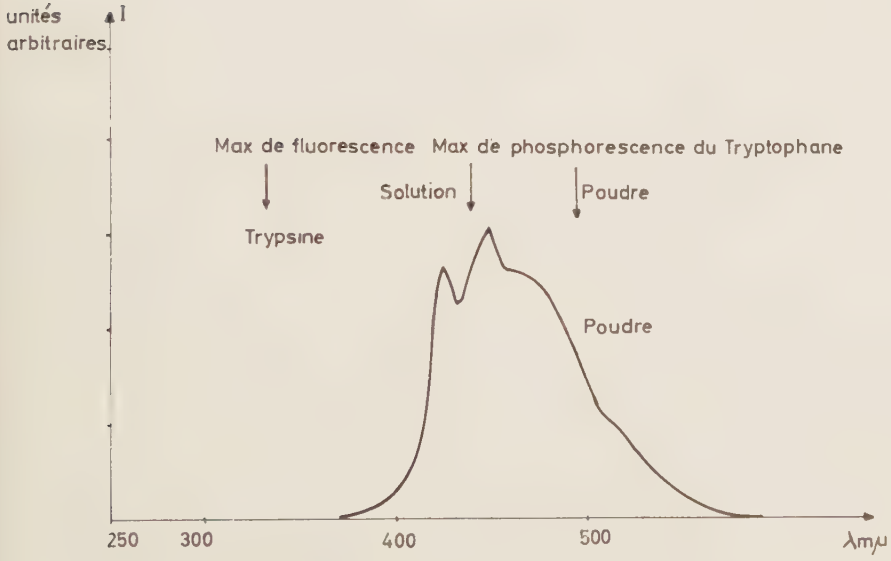


Fig. 30 Emission de la Trypsine

Vers les courtes longueurs d'onde il y a un épaulement très net pour l'albumine, correspondant à l'émission de la tyrosine (λ_{max} en solution = 395 mμ).

La durée moyenne de vie à 390mμ est quatre fois plus courte qu'à 440 mμ.

c) Pour la RNase la position du pic d'émission ne correspond pas à celui de la tyrosine en solution (il serait plus voisin de la phénylalanine en poudre). Quant à la durée moyenne de vie ($\simeq 3,8$ s) elle est intermédiaire entre celle de la phénylalanine et celle de la tyrosine en solution.

d) Les cinétiques de décroissance sont complexes sauf pour la trypsine en poudre où la cinétique est de premier ordre ($\tau = 4$ s).

e) En plus de la phosphorescence normale correspondant sensiblement à l'émission des acides aminés aromatiques et dont la durée moyenne est de quelques secondes, les protéines suffisamment irradiées émettent une luminescence de "très longue durée" (30 s à 1 mn pour des irradiations monochromatiques à 280 mμ, pendant 10 secondes avec une lampe à xénon de 150 watts).

Les études photochimiques nous conduisent à penser que cette luminescence provient d'une recombinaison du même type que celle qui intervient lorsqu'on réchauffe rapidement pour obtenir la thermoluminescence.

4. Conclusion

Longtemps, on a considéré que l'émission de phosphorescence des protéines se réduisait à l'émission du tryptophane. En fait les mesures plus fines ont montré l'existence possible d'une émission due à la tyrosine. Récemment, AUGENSTEIN (39) a relevé une telle émission particulièrement nette avec la déhydrogénase alcoolique. Les conclusions sont les suivantes :

- l'émission des protéines n'est pas que la simple somme des émissions de ses constituants aromatiques. S'il est impossible de détecter la phénylalanine, on peut par contre mettre en évidence l'émission de la tyrosine.

- l'existence d'un transfert Tyrosine → Tryptophane dans les protéines est donc discutable. Nous avons vu que le quenching de la fluorescence de la tyrosine peut s'expliquer par une interaction avec la chaîne peptidique et des groupements environnants fortement électronégatifs. Mais les variations d'intensité de la phosphorescence de la tyrosine au sein d'une protéine en fonction des conditions de milieu mettent deux phénomènes en composition :
- l'intersystem crossing qui peut varier avec l'environnement,
- le transfert d'énergie qui dépend essentiellement de la position respective des groupements intéressés.

Une étude quantitative sur les peptides simples, une amélioration des mesures (résolution, temps de vie) et de la pureté des composants (influence des ions lourds sur le couplage spin-orbite) permettra de préciser l'importance relative d'un phénomène par rapport à l'autre.

Cette étude optique des deux premiers états excités : singulet et triplet nous a permis de préciser quelques-unes de leurs propriétés fondamentales. Le fait le plus important étant l'influence du milieu sur la désactivation de la molécule à partir de l'état excité ou le passage singulet → triplet.

Cette étude qui est restée très qualitative va cependant nous permettre d'aborder une expérimentation d'un type très différent qui concerne les propriétés magnétiques de l'état triplet.

3ème Partie - III. 3 - ETUDE DE LA RESONANCE MAGNETIQUE DE L'ETAT TRIPLET

Les mesures de susceptibilité statique faites par D. F. EVANS (40) et par LEWIS et CALVIN (41) ont conduit ces auteurs à admettre le caractère paramagnétique (S = 1) de l'état triplet responsable de la phosphorescence. Mais, jusqu'en 1958, aucune mesure de RPE n'est venue confirmer ces résultats, malgré le développement très important de la technique sur le plan instrumental. Des raisonnements basés sur la très grande anisotropie de l'état électronique conduisaient à admettre pour des molécules orientées au hasard, un élargissement de la raie rendant toute détection impossible.

L'utilisation de monocristaux ne permettant pas d'obtenir de meilleurs résultats, il convient donc de mettre en valeur l'idée de C. A. HUTCHISON et B. W. MANGUM (42) qui, se basant sur les travaux de Mac CLURE (43) réussirent à préparer un cristal mixte de naphtalène dans le durène et à observer la résonance magnétique du triplet du naphtalène. Les développements décisifs furent ensuite donnés par VAN DER WAALS et DE GROOT (44) qui montrèrent la possibilité d'utiliser des solutions en réalisant la transition interdite $\Delta m = 2$. La méthode a pris alors beaucoup d'extension sur le plan expérimental et aussi sur le plan théorique grâce aux remarquables travaux de LEFEBVRE et KOTTIS (45). Dans le domaine des molécules biologiques très peu de résultats ont été publiés jusqu'ici, depuis notre première note (46) sur la détection des triplets des amino-acides. GRIBOVA (47) et ses coll. se sont intéressés plus spécialement aux molécules porphyriques. Très récemment, T. SHIGA et L. H. PIETTE (48) ont retrouvé sur les protéines la résonance magnétique de l'état triplet du tryptophane.

L'étude de l'état triplet par RPE a un double intérêt :

a) Détermination des caractéristiques électroniques de cet état excité : anisotropie, facteurs de "splitting" (D et E), comparaison avec le calcul théorique, etc...

b) Etude des propriétés énergétiques et photochimiques de l'état triplet : transfert, annihilation, réactions photochimiques, etc...

Nous nous sommes intéressés à deux catégories de composés :

a) Les carbures aromatiques

Actuellement, c'est en effet le seul domaine où sur des molécules bien choisies (symétrie), on a pu obtenir des résultats suffisamment précis (sensibilité) pour permettre une interprétation quantitative satisfaisante. Cette étude constitue donc une "référence" permettant de préciser les modalités d'application de la méthode dans d'autres domaines.

b) Les acides aminés aromatiques

Les difficultés expérimentales rendent pour le moment l'étude plus qualitative en ce qui concerne la structure électronique mais par contre, nous montrerons la possibilité d'études photochimiques.

III. 3. 1- ETUDE THEORIQUE DE LA RESONANCE MAGNETIQUE DE L'ETAT TRIPLET

A - Etude qualitative. L'état triplet correspond à l'existence dans la molécule de deux électrons dont les spins sont parallèles (S = 1); l'un de ces électrons se trouvant sur une orbite d'un état excité π^*. Le phénomène fondamental sera donc l'interaction dipôle-dipôle, cette interaction étant comparée à celle avec le champ directeur statique. Soit deux dipôles magnétiques identiques $\vec{M}_1$ et $\vec{M}_2$ placés dans un champ magnétique statique $\vec{H}_o$. L'interaction entre les spins dépend de la grandeur et de l'orientation relative de ces moments magnétiques et aussi de la longueur et de l'orientation du vecteur qui les joint. Nous supposerons que ce dernier vecteur ne varie pas, c'est-à-dire que nous avons affaire à une molécule isolée indéformable placée dans un milieu rigide (cristal mixte ou en solution dans un verre organique)

Le nombre quantique magnétique M peut prendre trois valeurs -1, 0, +1, qui correspondent aux trois orientations possibles du moment angulaire total dans le champ statique. Le problème est de voir s'il y a des transitions possibles entre ces états et quelles sont les règles de sélection à appliquer.

L'intéraction dipôle-dipôle entre les deux moments :

$\vec{M}_1 = \gamma_1 \vec{J}_1 \hbar$ et $\vec{M}_2 = \gamma_2 \vec{J}_2 \hbar$ s'écrit:

$$W_{12} = \frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar^2}{r_{12}^3} \left\{ \vec{J}_1 \vec{J}_2 - 3 \cdot \frac{(\vec{J}_1 \vec{r}_{12})(\vec{J}_1 \vec{r}_{12})}{r_{12}^2} \right\} \quad (1)$$

a) Pour une distribution spatiale sphérique des électrons considérés cette interaction est en moyenne nulle. Il n'y a donc pas levée de dégénérescence. C'est le cas d'un état triplet atomique.

b) Pour une molécule qui possède un axe de symétrie de révolution au moins ternaire la quantification se fera sur cet axe et la dégénérescence sera partiellement levée avec deux niveaux énergétiques : l'un correspond à $m_z = \pm 1$ et l'autre à $m_z = 0$.

c) Pour les molécules de symétrie plus basse et non symétriques, la dégénérescence sera complètement levée et il y a trois niveaux énergétiques X, Y, Z correspondant aux trois orientations possibles du moment angulaire de spin selon les axes principaux de la molécule.

On peut décrire l'interaction au moyen des "champs locaux". En effet $W_{12} = - \vec{M}_1 \cdot \vec{H}_{12}$ où $\vec{H}_{12}$ est le champ local produit par le spin 1 à l'emplacement du spin 2.

Pour des distances entre les spins de quelques angströms, le champ local atteint facilement des valeurs élevées de l'ordre de 1000 gaus par exemple.

Le moment $\vec{M}_1$ effectue autour de $\vec{H}_0$ un mouvement de précession de LARMOR; il y a donc une composante statique le long de $\vec{H}_0$ et une composante variable qui tourne dans un plan perpandiculaire à $\vec{H}_0$ (il en est de même pour $\vec{M}_2$) $\vec{M}_1$ crée donc en $\vec{M}_2$ un champ qui peut être décomposé en une composante statique dont l'orientation par rapport à $\vec{H}_0$ dépend de la position relative des deux spins et en une composante tournante. Le champ statique à l'emplacement de $\vec{M}_2$ est donc modifié; si $\vec{H}_0$ est suffisamment grand il n'y a que la composante parallèle ou anti-parallèle qui joue un rôle appréciable. De la même façon, le champ tournant est modifié par la composante tournante qui se trouve dans un plan perpandiculaire à $\vec{H}_0$. Lorsque l'interaction dipolaire sera du même ordre de grandeur que l'interaction avec le champ directeur $\vec{H}_0$ la composante du moment angulaire suivant la direction $\vec{H}_0$ ne sera plus constante et la règle de sélection $\Delta M = \pm 1$ ne s'applique plus. Ceci traduit le fait qu'il n'y a pas d'état quantique pur, mais un mélange d'états quantiques $|M>$. Par exemple, l'état M est en réalité un état : $|M> + \alpha\,|M-1> \ldots\ldots$

On convient cependant de caractériser, même en champ faible, chaque niveau d'énergie par son état quantique en champ fort qui est pratiquement pur. Pour le triplet, pour toute valeur du champ, on emploiera donc les nombres quantiques magnétiques -1, 0, +1.

En champ faible, il est possible d'induire des transitions peu intenses entre des états tels que $|M-1> + \alpha_1$ (contribution d'autres états)

et $|M+1> + \alpha_2$ (contribution d'autres états)

Selon notre convention d'écriture il s'agira donc de transition $\Delta M = 2$.

Cette première approche purement descriptive nous permet de prévoir que :

- la résonance magnétique de l'état triplet conduira à deux types de transitions $\Delta M = \pm 1$ et $\Delta m = 2$.
- la position des raies de résonance dépendra essentiellement de la disposition des trois sous-niveaux d'énergie en champ nul c'est-à-dire de la symétrie moléculaire et de valeur de la constante de couplage.

Remarque. On retrouve un effet analogue dans la résonance des ions de transition placés dans un champ cristallin (Cr^{3+} dans le rubis, par exemple) ou pour un champ directeur H_0 qui n'est pas confondu avec l'axe de symétrie cristalline et pour des valeurs suffisamment basses de ce champ H_0. on a des mélanges d'états quantiques et la possibilité de transition à $\Delta M = 2$.

Ces transitions peuvent être utilisées dans le fonctionnement du "Maser".

B - Etude quantitative

1) Cas d'une molécule isolée

Pour le problème des deux électrons à spins parallèles, dans une molécule fixe, l'Hamiltonien le plus général peut s'écrire :

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_{ss} + \mathcal{H}_m$$

$\mathcal{H}_Z$ = terme correspondant à l'interaction Zeeman,

$\mathcal{H}_{ss}$ = terme correspondant à l'interaction dipolaire entre les spins électroniques,

$\mathcal{H}_m$ = terme correspondant aux interactions moléculaires en champ nul, autre que l'interaction dipolaire s-s (il s'agit essentiellement de l'interaction spin-orbite).

Pour les molécules organiques portées dans le premier état triplet, la levée de dégénérescence en champ nul est essentiellement due à l'interaction s-s, l'interaction spin-orbite n'intervenant que comme terme du deuxième ordre. Nous nous interresserons donc plus spécialement au terme:

$$\mathcal{H}_{ss} = g^2 \beta^2 \sum_{12} \left\{ \frac{\vec{S}_1 \vec{S}_2}{r_{12}^3} - 3 \frac{(\vec{r}_{12} \cdot \vec{S}_1)(\vec{r}_{12} \cdot \vec{S}_2)}{r_{12}^5} \right\} \quad (2)$$

$\vec{S}_1$ et $\vec{S}_2$ sont les opérateurs de spins en unité $\hbar$

r_{12} : la distance interélectronique

g : le facteur de fission spectroscopique

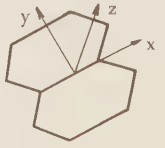
β : le magnéton de Bohr

Remarquons que la formule (2) représente exactement la forme (1) avec une écriture différente (on remplace $\vec{m}_1$ par $g \beta \vec{S}_1$)
On peut écrire l'Hamiltonien d'interaction sous une forme encore différente.

$$\mathcal{H}_{ss} = - \left\{ X S_x^2 + Y S_y^2 + Z S_z^2 \right\}$$

soit en ajoutant l'interaction Zeeman $\mathcal{H}_{ss} = g \beta \vec{H}_o \vec{S} - \left\{ X S_x^2 + Y S_y^2 + Z S_z^2 \right\}$ (3)

S_x, S_y, S_z, sont les composantes du spin total $\vec{S} = \vec{S}_1 + \vec{S}_2$ associé aux deux électrons dans un système de coordonnées ayant pour axes, les axes principaux de la molécule. Il s'agit du système d'axes qui diagonalise le tenseur de couplage spin-spin. Un tel système d'axes existe toujours. Il peut être déterminé facilement pour les molécules présentant une symétrie suffisante, le naphtalène par exemple. Dans ce cas on a un système d'axes trirectangulaires disposés de la façon suivante :



Pour des molécules de symétrie inférieure, ces axes peuvent être déterminés expérimentalement à partir de mesure de résonance sur les triplets de molécules orientées. X, Y, Z sont les valeurs propres de ce tenseur dans ce système d'axes. Ces paramètres caractérisent la répartition spatiale des électrons et sont égaux aux énergies en champ nul des trois sous-niveaux.

Pour une distribution sphérique (atome, exciton) $X = Y = Z = 0$

Pour une molécule possédant 2 axes équivalents $X = Y = -\frac{1}{2} Z$

Pour une molécule quelconque $X \neq Y \neq Z$.

Mais dans tous les cas on a $\underline{X + Y + Z = 0}$

Très souvent on utilise au lieu de Z, Y, Z les paramètres D et E pour caractériser la séparation des niveaux en champ nul.

Avec les relations $X = \frac{D}{3} + E \qquad Y = \frac{D}{3} - E \qquad Z = -\frac{2}{3} D$

Pour une molécule ayant les 2 axes équivalents: $E = 0 \quad D \neq 0$

Pour une molécule de symétrie inférieure $E \neq 0$ et $D \neq 0$.

L'Hamiltonien s'écrit alors :

$$\mathcal{H}_{ss} = -\left\{ D \left(S_z^2 - \frac{1}{3} S^2\right) + E \left(S_x^2 - S_y^2\right) \right\}$$

En tenant compte du terme d'interaction Zeeman et en sachant que $S^2 = S(S+1)$

$$\mathcal{H} = g\beta \vec{H}_o . \vec{S} + DS_z^2 + E \left(S_x^2 - S_y^2\right) - \frac{2}{3} D.$$

Les grandeurs X, Y, Z ou D et E peuvent être calculées à partir de la fonction :

$$\psi_{(1,2)} = | \varphi_{(1,2)} , m_s > .$$

où $\varphi_{(1,2)}$ est la partie antisymétrique de la fonction d'onde.

On peut écrire selon (50)

$$D = 3\beta^2 < \varphi_{(1,2)} \left| (r_{1,2}^2 - 3 z_{1,2}^2) / r_{1,2}^5 \right| \varphi_{(1,2)} >$$

$$E = 3\beta^2 < \varphi_{1,2} \left| (y_{12}^2 - x_{12}^2) / r_{12}^5 \right| \varphi_{(1,2)} > .$$

Désignons par $\vec{h}$, le vecteur unité correspondant au champ directeur $\vec{H}_o$ En supposant toujours que le facteur g est isotrope et à partir de fonctions de base $\psi_{(1,2)}$ on peut écrire la matrice de l'Hamiltonien (3). Les axes de référence étant toujours les axes moléculaires précédemment définis.

Pour une molécule isolée ayant une orientation donnée par rapport à H_o, l'équation aux valeurs propres qui donne les valeurs des niveaux d'énergie est la suivante :

$$\varepsilon^3 + \varepsilon \{ XY + YZ + ZX - (g\beta H)^2 \} + (g\beta H)^2 \{ Xh_x^2 + Yh_y^2 + Zh_z^2 \} - XYZ = 0 \quad (5)$$

La résonance a lieu lorsque la différence entre deux racines de cette équation est égale à $\delta = h\nu$ (quantum hyperfréquence).

La résolution de l'équation (5) est facilitée si l'on prend H_o suivant l'un des axes principaux. Pour H_o // Ox on a par exemple :

$$\varepsilon_1 = X$$

$$\varepsilon_{2,3} = \frac{Y + Z}{2} \pm \sqrt{\frac{1}{4}(Y - Z)^2 + (g\beta H)^2}$$

Pour H_o // Oy on a

$$\varepsilon_1 = Y$$

$$\varepsilon_{2,3} = \frac{X + Z}{2} + \sqrt{\frac{1}{4}(X - Z)^2 + (g\beta H)^2}$$

En prenant les valeurs trouvées par HUTCHISON et MANGUM soient en cm^{-1}

$X = 0,0197$ $Y = 0,0471$ $Z = -0,0669$ et $g = 2,00$.

nous avons tracé sur la figure 31 les courbes représentatives des niveaux d'énergie du triplet de la molécule de naphtalène en fonction du champ magnétique.

Au voisinage de $H_o = 0$, les niveaux d'énergie deviennent pratiquement horizontaux. Les intersections avec l'axe vertical correspondent aux grandeurs X, Y, Z. Nous avons également fait figurer les valeurs D et E.

Remarques :

1) La numérotation des axes qui est arbitraire détermine les valeurs de D et E. Le signe absolu de D qui a une signification physique peut être déterminé par des mesures à la température de l'hélium liquide, comme l'ont montré HORNIG et HYDE (49).

2) Toutes les énergies données en : cm^{-1} sont divisées par : hc.

Pour des valeurs élevées du champ H_o, le terme d'interaction dipolaire agit seulement comme perturbation et on se rapproche d'états quantiques purs $|-1>$ et $|1>$.

En champ faible c'est au contraire le terme d'interaction Zeeman qui représente le terme de perturbation et les états quantiques sont complexes.

Pour une valeur donnée du photon $\delta = h\nu$ il y a deux sortes de transitions possibles : les transitions $\Delta m = 1$ en champ fort

$$|-1> \rightarrow |0> \quad \text{et} \quad |0> \rightarrow |1>$$

les transition $\Delta m = 2$ en champ faible

$$|-1| \rightarrow |1>$$

Soit H_1 le champ oscillant de radiofréquence qui induit la transition et $\gamma_{x,y,z}$ ses cosinus directeurs dans le système des axes moléculaires.

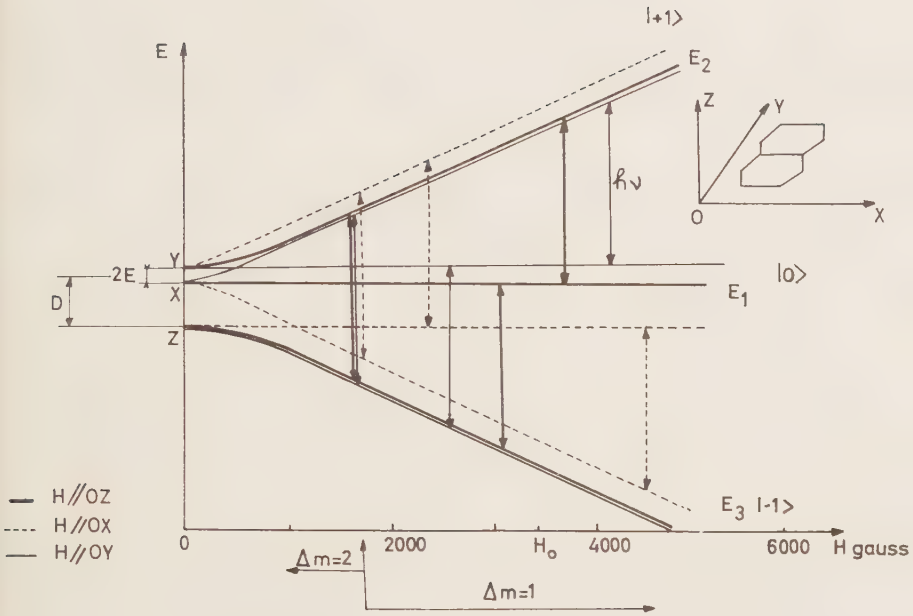


Fig. 31 Niveaux d'énergie du naphtalène

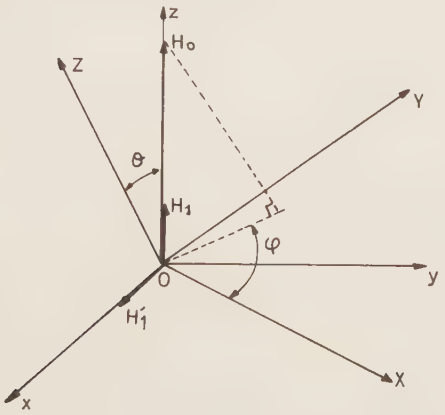


Fig. 32 Position du champ magnétique par rapport aux axes moléculaires

La probabilité de transition entre les niveaux i et j est de la forme :

$$B = \sum_{x,\,y,\,z} \gamma^2_{x,\,y,\,z} \left| \langle \varphi_i \left| S \right| \varphi_j \rangle \right|^2$$

φ_i et φ_j étant les fonctions propres de spin qui s'expriment en fonction de X, Y, Z et des fonctions d'ordre zéro : T_x, T_y, T_z données par HAMEKA et OOSTERHOFF (51). Pour une transition $T_x \rightarrow T_y$, le moment de transition est perpendiculaire au plan x, y. Sans perdre de généralité on peut raisonner sur la molécule de naphtalène avec les axes précédemment définis. Dans la pratique, le champ hyperfréquence est // ou $\perp$ au champ statique. On obtient alors les résultats :

a) Pour un champ $H_1 \perp H_0$ il y a deux transitions possibles du type $\Delta m = 1$ pour une orientation donnée de la molécule par rapport à H_0.

b) Pour un champ H_1 // H_0 la probabilité de transition $|-1> \rightarrow |1>$ n'est pas nulle.

$$\text{Pour } H_0 \text{ // Ox on a } B = \frac{32\pi^3}{3h^2} \beta^2 \left| \varphi_{|1>} \left| S_x \right| \varphi_{|-1>} \right|^2$$

$$= \frac{32\pi^3}{3h^2} \beta^2 \frac{(Y - Z)^2}{\delta^2} \quad \text{et} \quad \frac{(Y - Z)^2}{\delta^2} = 0,126$$

Il est même possible de calculer la valeur du champ de résonance en écrivant :

$$\varepsilon_2 - \varepsilon_3 = \delta \; (g\beta H)^2 = \frac{1}{4} \left\{ (\varepsilon_2 - \varepsilon_3)^2 - (Y - Z)^2 \right\} = \frac{1}{4} \left\{ \delta^2 - (Y - Z)^2 \right\}$$

$H_x = 1602$ gauss.

On peut faire le même calcul pour H_0 // Oy et H_0 // Oz. La probabilité de transition dans ce dernier cas est faible (= 0,0088).

Conclusion

Cette première approche nous permet de préciser les règles essentielles de la résonance magnétique de l'état triplet :

Il y a deux types de transitions possibles :

a) Transition $\Delta m = 1$ avec polarisation perpendiculaire du champ hyperfréquence, 2 raies. Transitions très anisotropes.

b) Transition $\Delta m = 2$ avec polarisation parallèle du champ hyperfréquence, 1 raie, transition peu anisotrope, intensité plus faible.

Pour des molécules orientées parallèlement dans un monocristal (naphtalène dans le durène) on observe expérimentalement ces transitions (42). Pour les transitions $\Delta m = 1$ on obtient même une structure hyperfine due à l'interaction du triplet avec les protons de la molécule.

Nous allons maintenant passer au cas d'une assemblée de molécules orientées au hasard dans un milieu rigide, c'est le cas des solutions ou des poudres microcristallines.

2) Cas d'un ensemble de molécules orientées au hasard

Van der WAALS et de GROOT ont donné un mode de traitement du problème dans le cas des molécules possédant une symétrie ternaire : triphénylène, coronène, c'est-à-dire dans le cas où les axes X et Y sont équivalents : X = Y et E = 0. Pour les molécules de symétrie inférieure $E \neq 0$, et nous suivrons dans ce cas le mode de résolution plus général de KOTTIS et LEFEBVRE. Très recemment WASSERMAN, SNYDER et YAGER (50) ont publié les résultats d'une étude de ce même problème et avec un mode de traitement légèrement différent ils parviennent à des conclusions générales très voisines de celles des auteurs précédents.

La position relative du champ H_o et des axes moléculaires sera définie par les angles θ et φ figurés en (32). On ramène donc la discussion à l'étude des conditions de résonance en fonction de la variation de ces deux paramètres.

La résonance se produit lorsque la différence de racines de l'équation séculaire (5) est égale à $\delta = h\nu$, quantum hyperfréquence. Cette condition s'écrit :

$$X\sin^2\theta\cos^2\varphi + Y\sin^2\theta\sin^2\varphi + Z\cos^2\theta = (XYZ)(g\beta H)^{-2} \pm 3^{3/2}\left\{(g\beta H)^{-2}(\delta^2 + XY + XZ + YZ) - 1\right\} \times \left\{4(g\beta H)^2 - \delta^2 - 4(XY + XZ + YZ)\right\}^{1/2} \quad (6)$$

c'est-à-dire qu'on obtient une équation du type : $f(\theta, \varphi) = F(H, \delta)$

Pour une molécule donnée et pour une orientation donnée (θ et φ constants), on peut construire la courbe $y = F(H, \delta)$, δ étant également une constante. Les points d'intersection de cette courbe avec une droite $y = f(\theta, \varphi)$ donnent les valeurs des champs de résonance, pour cette molécule, dans ces conditions.

LEFEBVRE et KOTTIS ont construit la courbe $y = F(H, \delta)$ pour le naphtalène en prenant les valeurs de X, Y, Z données précédemment, $g = 2{,}0030$ et $\delta = 0{,}3095\ cm^{-1}$. Cette courbe est représentée sur la figure 33. L'intersection avec une droite parallèle à l'axe des H donne les trois valeurs des champs de résonance : deux valeurs pour $\Delta m = 1$ et une pour $\Delta m = 2$. Pour une molécule isolée, on obtient donc les résultats donnés dans la précédente discussion.

Pour une assemblée de molécules, il faut étudier la variation de la fonction $f(\theta, \varphi)$ en fonction des deux paramètres angulaires. La valeur maximum de cette fonction est $|Z|$. En faisant varier progressivement $f(\theta, \varphi)$ on obtient un étalement progressif des champs de résonance et on devrait s'attendre à l'impossibilité de détecter un signal de RPE. Cette anisotropie était à la base des raisonnements par lesquels bon nombre d'auteurs justifiaient l'absence de signal de RPE du à l'état triplet. En fait, nous allons montrer qu'il existe des valeurs stationnaires du champ pour lesquelles on a une accumulation des signaux conduisant à l'apparition d'une raie dont la largeur est de l'ordre de quelques dizaines de gauss au plus. Le champ sera stationnaire lorsque pour une variation petite df de f on aura une variation dH très petite ou nulle.

$f(\theta, \varphi) = F(H, \delta)$ $\quad df = F'(H, \delta)\, dH$ $\quad dH = df/F'(H, \delta)$.

1) Le cas le plus simple, évident sur la courbe $F'(H, \delta) \to \infty$

On a donc la valeur d'un champ de résonance

$$H_{min} = (2g\beta)^{-1} \{\delta^2 + 4 (XY + XZ + YZ)\}^{1/2}$$

$$H_{min} = (2g\beta)^{-1} \{\delta^2 - \frac{4}{3} (D^2 + 3 E^2)\}^{1/2}$$

$$H_{min} = (2g\beta)^{-1} \{\delta^2 - \frac{4}{3} D^{*2}\}^{1/2}$$

avec $D^* = (D^2 + 3 E^2)^{1/2}$

Pour les molécules ayant une symétrie au moins ternaire $E = 0$ donc $D^* = D$. Dans les autres cas, la grandeur obtenue par la mesure de H_{min} sera la valeur de D^* donnée par la formule précédente.

Les molécules donnant la résonance pour cette valeur du champ ont des orientations déterminées par : $f(\theta, \varphi) = 0$

Pour $0 < \varphi < \frac{\pi}{2}$, on a $\theta_1 < \theta < \theta_2$,

les valeurs extrêmes θ_1 et θ_2 étant déterminées par X, Y, Z.

Conclusion

En allant dans le sens des champs croissants on aura donc une première raie de résonance, correspondant à toute une série d'orientations possibles des molécules par rapport au champ statique. Comme nous allons le voir cette raie possède des caractéristiques particulières tant du point de vue de la valeur du champ résonnant que de la polarisation et de l'intensité qui la rendent tout à fait remarquable pour l'étude du triplet en RPE.

2) On peut avoir aussi le cas $df = 0$ bien que $F' \neq 0$

Ceci se produit pour

$$\theta = 0$$

$$\theta = \frac{\pi}{2} \quad \varphi = 0$$

$$\theta = \frac{\pi}{2} \quad \varphi = \frac{\pi}{2}$$

c'est-à-dire lorsque le champ directeur se trouve suivant l'un des trois axes moléculaires. Pour chacune de ces orientations préférentielles il y a donc accumulation des champs de résonance autour des valeurs suivantes.

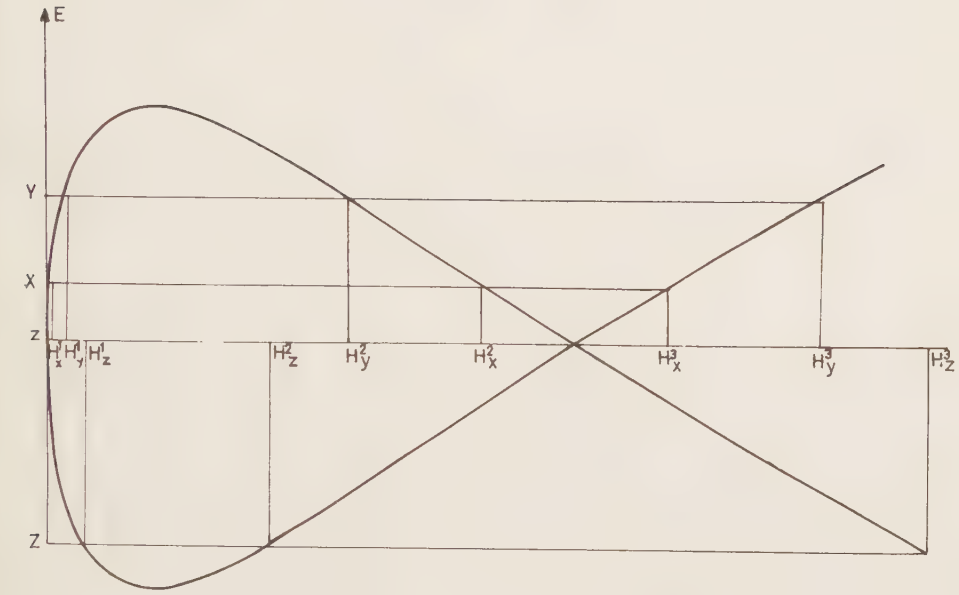


Fig. 33 Courbe représentative de la fonction représentative $y=F(H,\delta)$ pour la naphtalène

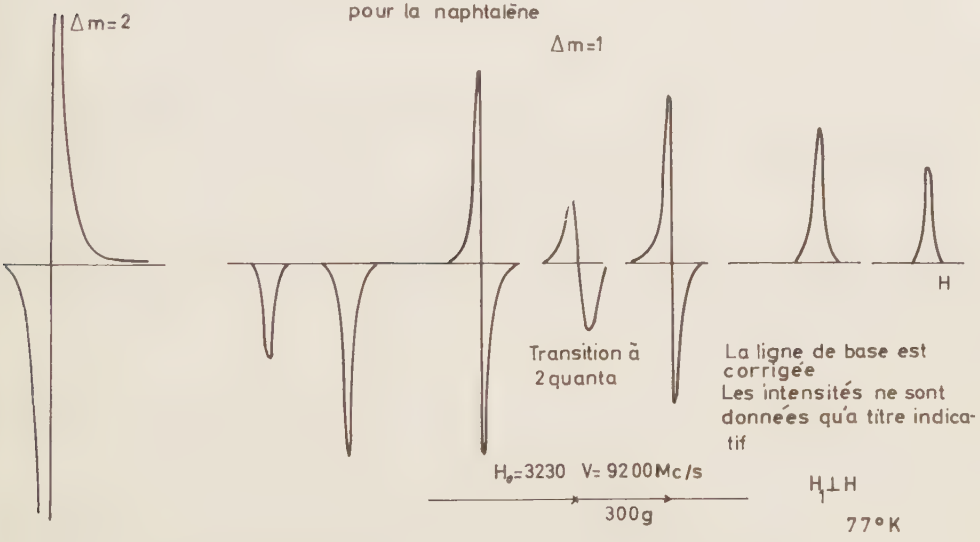


Fig. 34 Spectre de résonance du naphtalène d_8 en solution

a) H_o // OX $\quad H_x^{1} = (2g\beta)^{-1} \{\delta^2 - (Y-Z)^2\}^{1/2}$

$$H_x^{II} = (2g\beta)^{-1} \{(2\delta - 3X)^2 - (Y-Z)^2\}^{1/2} \quad (7)$$

$$H_x^{III} = (2g\beta)^{-1} \{(2\delta + 3X)^2 - (Y-Z)^2\}^{1/2}$$

b) H_o // OY on obtient les six valeurs du champ par

H_o // OZ permutation circulaire.

Conclusion

Ce résultat qui est tout à fait général, puisqu'il a été établi à l'aide d'expressions qui ne présument en rien des valeurs relatives des grandeurs fondamentales X, Y, Z et δ, conduit donc à la situation suivante : en allant dans le sens des champs croissants on aura donc la possibilité d'obtenir après la raie H_{min}, 9 raies de résonance, chaque groupe de 3 raies correspondant à une orientation préférentielle du champ H_o suivant l'un des axes principaux du tenseur de couplage spin-spin. Le spectre réel dépendra en fait de la symétrie moléculaire et de la constante de couplage c'est-à-dire de X, Y, Z, ainsi que des conditions expérimentales réalisées c'est-à-dire, pour une polarisation correcte du champ hyperfréquence, de la valeur de δ .

En 3 cm dans le cas du naphtalène en solution, on obtient effectivement les 10 raies.

Pour cette même molécule P. KOTTIS et R. LEFEBVRE ont construit les courbes : F (H, δ) pour des fréquences différentes et montrent la modification progressive du spectre en fonction de δ .

Polarisation des transitions . Intensité. Forme générale du spectre.

Nous avons vu que la probabilité de transition entre deux états électroniques s'exprime de la façon suivante :

$$B = \sum_{x,y,z} \gamma^2_{x,y,z} \; | < \varphi_i | \; S \; | \varphi_j > |^2$$

φ_i et φ_j étant les fonctions propres de spins qui sont des combinaisons linéaires de la forme :

$$\varphi_k = \sum_{x,y,z} C^k_{x,y,z} \; T_{x,y,z}$$

Les règles de polarisation seront les mêmes que pour une molécule isolée c'est-à-dire que pour les 6 champs stationnaires correspondant à $\Delta m = 1$ on devra avoir une polarisation perpendiculaire du champ hyperfréquence $H_1 \perp H_o$ alors que pour les 3 champs stationnaires correspondant à $\Delta m = 2$ on aura H_1 // H_o.

Dans le cas particulier de la transition H_{min} les deux polarisations H_1 // et $H_1 \perp$ sont possibles.

L'intensité de la raie de résonance est donnée par une intégrale de la forme :

$$g(H) = \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \ \overline{B}(\theta, \varphi) \delta \left\{H - H(\theta, \varphi)\right\} \sin\theta \quad (8)$$

où $\overline{B}(\theta, \varphi)$ est la valeur moyenne de la probabilité de transition pour une orientation donnée du champ hyperfréquence. Dans la pratique on aura toujours soit H_1 // soit $H_1 \perp$ Ho

$$\int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \ \delta\left\{H - H(\theta, \varphi)\right\} \sin\theta \quad (9)$$

est la double intégrale donnant à un facteur $\frac{1}{\mathcal{H}\pi}$ près, le nombre de molécules dont les champs de résonance sont compris entre H et H + dH.

De la même façon, que $\overline{B}$, la fonction $H(\theta, \varphi)$ exprimant la variation de H pour toutes les orientations possibles des molécules, a des valeurs stationnaires conduisant aux champs résonnants : H_{min}, $H_x{}^1$, etc...

Ces valeurs stationnaires étant données par $\frac{\partial H}{\partial \theta} = 0$ et $\frac{\partial H}{\partial \varphi} = 0$

La résolution de (8) conduit en fait à calculer la dérivée $= \frac{dg(H)}{dH}$ qui peut être directement comparée à la courbe expérimentale obtenue.

$\frac{dg(H)}{dH}$ En admettant une largeur de raie infiniment faible, on peut exprimer en fonction de θ (H, φ) ou mieux de $\frac{d \cos\theta(H, \varphi)}{dH}$

Pour les valeurs remarquables de H et φ , c'est-à-dire H_{min}, φ quelconque ou $H = H^1{}_x$, $H^1{}_y$ ou $H^1{}_z$, $\varphi = 0$, $\frac{d \cos\theta(H, \varphi)}{dH} \longrightarrow \infty$

c'est-à-dire $\frac{dg(H)}{dH} \longrightarrow \infty$ il s'agit en fait d'un maximum correspondant à un point d'inflexion sur la courbe d'absorption. Cette mode de représentation coïncide d'une façon déjà très intéressante avec les résultats expérimentaux dans le cas des molécules à symétrie ternaire. Des améliorations peuvent être apportées si on fait intervenir une demi-largeur de raie λ constante provenant de l'interaction hyperfine avec des protons. On obtient alors un déplacement de quelques gauss des extréma, par rapport aux valeurs des champs résonnants déduites des mesures faites sur le cristal. P. KOTTIS et R. LEFEBVRE proposent des relations linéaires du type suivant dans le cas du d-naphtalène :

$$H_{min} = H_o + 0,3\,\lambda \pm 0,1\,\lambda$$

H_o est le premier maximum de la courbe dérivée.

$$\lambda = \Delta H_o \ (1,5 \pm 0,2)$$

ΔH_o : distance entre le premier maximum et la première valeur nulle de la courbe dérivée.

La représentation s'améliore beaucoup en tenant compte de l'anisotropie du facteur g et de la variation de la largeur de la raie en fonction de l'orientation. La courbe dérivée calculée à partir de l'expression générale (8) coïncide alors pratiquement avec la courbe dérivée donnée par l'expérience.

Conclusion :

Il ressort de cette rapide analyse que des renseignements essentiels : symétrie, constante de couplage, peuvent être fournis par l'analyse du spectre de résonance de l'état triplet de molécules phosphorescentes en solution. Il existe en effet une corrélation entre la position et l'intensité des pics et les champs stationnaires correspondant aux orientations canoniques de la molécule. Une première approche peut être faite en utilisant un facteur g isotrope et une largeur de raie constante. Mais une représentation plus exacte à l'aide de l'Hamiltonien nécessite l'introduction de paramètres complexes tenant compte de l'anisotropie des diverses actions s'exerçant sur les spins. L'existence d'orientations préférentielles liées à la structure moléculaire de l'espèce paramagnétique reste cependant le fait expérimental essentiel.

III. 3. 2. - PROBLEMES EXPERIMENTAUX

L'utilisation exclusive de cristaux mixtes pour la résonance magnétique de l'état triplet serait une sérieuse limitation de la méthode puisque les résultats obtenus de cette façon ne concernent que quelques carbures aromatiques (naphtlène, phénanthrène, ...) inclus dans les matrices privilégiées que sont le durène et aussi le diphényle.

La possibilité d'utiliser des solutions élargit beaucoup le champ d'applications et a permis de mettre en évidence des phénomènes nouveaux la transition à deux quanta (52) les effets dynamiques d'échange d'énergie (53), l'intervention du triplet dans les réactions photochimiques. Nous nous sommes plus spécialement attachés à ce mode d'expérimentation qui comporte les problèmes particuliers suivants :

a) Problème des solvants

Nous avons déjà donné les éléments essentiels de ce problème. Pour les molécules d'intérêt biologique, les solubilités obtenues dans les solvants organiques classiques donnant des verres à basse température, sont faibles ou nulles. Les polymères tels que l'alcool polyvinylique peuvent être utilisés, ils sont l'inconvénient d'être moins transparents à l'u. v. et très sensibles à l'effet oxygène. Les concentrations obtenues avec un support d'acétate de cadmium sont pour le moment insuffisantes pour travailler correctement en R. P. E. L'étude des transitions $\Delta m = 1$ est dans ces conditions particulièrement délicate et nécessite une amélioration des performances de l'appareillage.

b) Problème d'appareillage

L'adaptation sur la cavité rectangulaire de mesure, d'un petit guide d'onde qui ne transmet pas l'onde 3 cm tout en permettant l'irradiation directe de l'échantillon, permet de multiplier par 2 la sensibilité par rapport au système classique de fenêtre à fentes parallèles. La source la plus utilisée est une lampe à vapeur de mercure HBO 200 W fabriquée par OSRAM. L'énergie émise pour < 300 mμ est faible : sur un fond continu on trouve des raies à 296,8 mμ ; 289,4 mμ ; 280,4 mμ ; 275,3 mμ. L'émission à 253,7 mμ est très faible mais elle peut être néanmoins à l'origine de dégradations photochimiques gênantes. Avec une telle source, il est impossible d'utiliser des filtres inter-

férentiels ou un monochromateur pour obtenir une concentration suffisante de molécules à l'état triplet pour la RPE.

Nous nous sommes contentés la plupart du temps d'interposer un filtre à eau ou à $CuSO_4$ pour absorber le rayonnement infra-rouge ou les arcs au xénon plus puissants XBO 900 et XBO 1600 OSRAM permettent pour des concentrations suffisantes de molécules phosphorescentes, de gagner encore en sensibilité. Il faut alors limiter le temps d'irradiation pour éviter une dégradation photochimique trop rapide des solutions et soigneusement filtrer l'infra-rouge (sans variation apparente de la température de l'échantillon, il peut se produire des micro-fusions conduisant à une diminution importante de l'intensité de phosphorescence).

Une amélioration importante de la sensibilité de spectromètre et l'étude commode des cinétiques sera apportée par l'utilisation des systèmes à mémoire permettant d'augmenter de 10 à 20 fois le rapport signal/bruit de fond.

Pour que la comparaison entre le spectre théorique et le spectre expérimental soit fructueuse, il faut que les valeurs absolues des champs de résonance soient connues avec une précision de l'ordre de 1°/oo. De telles déterminations sont impossibles avec le fluxmètre à effet Hall dont nous disposions (fluxmètre BELL 240). Par contre la détermination des largeurs de raies peut être faite en utilisant le fluxmètre en différentiel. Autour de g = 2, un étalonnage très précis peut être fait à l'aide d'une double cavité dont le mode est H_{114}.

On utilise pour cela un radical libre stable : le peroxylamine disulfonate $(SO_3)_2\ NO_2^-$. Par interaction hyperfine avec le noyau d'azote de spin I = 1, il apparaît une structure hyperfine conduisant à trois raies bien séparées. Les valeurs numériques sont les suivantes.

Distance entre 2 raies : $\Delta H = 13,00 \pm 0,07$ gauss

facteur g : $= 2,0057 \pm 0,0001$

Le spectre obtenu peut donc servir pour mesurer des largeurs de raies et déterminer le facteur g avec une précision tout à fait remarquable.

Avec des pièces polaires d'électro-aimant de 15 cm de diamètre il y a lieu de positionner la cavité avec beaucoup de précision pour avoir une homogénéité suffisante au niveau de l'échantillon.

Une première amélioration consiste à utiliser le dispositif de stabilisation avec une sonde à effet Hall conçue par Varian (Fieldial) qui permet une lecture commode ($\simeq 1$ %) et qui élimine les décalages dus à l'hystérésis.

La meilleure précision ne sera cependant obtenue que lorsque nous disposerons d'un dispositif à résonance protonique complété par une chaîne de mesure de fréquence ($\pm 0,05$ gauss).

Remarque

Lors de l'enregistrement des triplets, nous ne disposions d'aucun de ces équipements de précision et nous avons choisi d'utiliser comme référence les valeurs données par VAN DER WAALS et DE GROOT pour le naphtalène.

Cavité à champ parallèle

Pour étudier les transitions $\Delta m = 2$ en polarisation parallèle, nous avons réalisé une cavité spéciale, adaptable au spectromètre VARIAN et dont les dimensions sont compatibles avec un entrefer de 7 cm (Figure 37).

Les premiers essais ont été faits avec des cavités de type rectangulaire et une modulation basse fréquence (400 c/s). Mais la sensibilité obtenue même à 77°K était très insuffisante même avec un montage hyperfréquence superhété - rodyne. Nous avons donc choisi de travailler à 100 kc/s avec une cavité cylindrique. Cette cavité en H_{011} est taillée dans un bloc de laiton. La paroi intérieure est soigneusement polie, puis dorée par voie électrochimique. Les deux parois planes sont constituées de disques de verre d'épaisseur 2mm et percés au centre de trous de 10 mm de diamètre pour le passage de l'échantillon. Ces parois en verre sont argentées intérieurement.

L'épaisseur du dépôt (0,5 à 0,7 μ) est calculée de façon à laisser passer la modulation de 100 kc/s. La couche obtenue par réduction chimique peut être relativement épaisse. Mais elle manque d'homogénéité et sa conductivité électrique est inférieure à celle d'une couche disposée par évaporation sous vide.

C'est donc par cette méthode que nous avons argenté ces parois latérales. La couche superficielle étant faite avec de l'or pour prévenir toute altération. Les bobines de modulation faites à l'aide de fil de cuivre émaillé de 2/10 mm ont une impédance adaptée au transformateur de sortie de l'unité de modulation 100 kc/s. Elles permettent d'obtenir au centre de la cavité un champ maximum d'environ 10 gauss. Une fenêtre comportant des fentes $\perp$ à l'axe a été aménagée dans la paroi pour permettre l'irradiation de l'échantillon. Le couplage au guide se fait à l'aide d'un iris ajustable. L'axe de la cavité est donc placé parallèlement au champ magnétique statique Ho. Dans le mode H_{011} il y a un noeud de champ magnétique selon cet axe et on a donc une polarisation parallèle $H_1 // H_o$. Nous avons ensuite réalisé un système de refroidissement permettant de maintenir l'échantillon à une température suffisamment basse. Pour cela, on fait circuler de l'azote sec et refroidi par circulation dans l'azote liquide, dans un petit dewar dans lequel est placé l'échantillon. La température obtenue est comprise entre 80°K et 85°K.

La manipulation est commode avec des échantillons solides (plastiques, verres minéraux). Par contre la préparation d'ampoules de 5 cm de long, convenablement remplies d'une solution organique nécessite une mise au point assez longue. La sensibilité obtenue avec cette cavité n'est pas encore comparable avec celle de la cavité habituelle utilisée en polarisation perpendiculaire. Mais une amélioration portant sur les conditions d'irradiation et le conditionnement des échantillons doit nous permettre d'améliorer très sensiblement ces performances.

III. 3. 3. - ETUDE EXPERIMENTALE DE LA RESONANCE MAGNETIQUE DE L'ETAT TRIPLET

Nous prendrons d'abord comme exemple le cas de quelques carbures aromatiques pour préciser le mode d'application et les limites de validité des

résultats théoriques précédents. En outre, les spectres intenses et bien résolus donnés par des composés tels que le naphtalène, le phénanthrène ou le coronène constituent des tests précieux pour l'appareillage.

A. Cas de quelques carbures aromatiques

1. Ce sont Y. A. YAGER (54) et ses collaborateurs qui, les premiers, ont publié le spectre de résonance correspondant aux transitions $\Delta m = 1$ pour le naphtalène d_8. Ce spectre peut être pris comme modèle puisqu'on obtient en polarisation //, puis en polarisation $\perp$ les dix raies possibles (en 3 cm) correspondant aux valeurs du champ résonant prévues par le calcul. Nous avons porté sur la Fig. 34 le spectre obtenu en polarisation $\perp$ pour une solution de naphtalène d_8 dans la décaline irradiée avec une HBO 200W. Ce spectre est pratiquement identique à celui du naphtalène ordinaire. La deutération en réduisant l'interaction hyperfine, conduit à une diminution de la largeur de la raie. Elle a également pour effet d'augmenter considérablement la durée moyenne de décroissance de la phosphorescence, puisqu'on passe de 2,2s à 18 s de $C_{10}H_8$ à $C_{10}D_8$. Pour la RPE c'est donc un moyen d'augmenter la résolution et l'intensité des spectres de résonance du triplet. L'amélioration de la résolution est particulièrement sensible pour les transitions $\Delta m = 2$ étudiées en polarisation parallèle. En effet, comme on peut le voir dans la Fig. 35, le spectre obtenu pour le naphtalène d_8 est bien résolu puisqu'on enregistre les 4 transitions correspondant à H_{min}, H^1_X, H^1_Y, H^1_Z.

Pour ne naphtalène ordinaire le pic H^1_X est pratiquement confondu avec celui de H_{min} et H^1_Z ne peut être détecté. Par contre, il est intéressant de noter que pour H^1_Y on obtient une faible structure qu'on peut attribuer à l'intéraction hyperfine. Nous n'avons cependant pas obtenu d'autres résultats expérimentaux pour confirmer cette possibilité d'obtenir des structures hyperfines en solution. Les seuls spectres entièrement résolus ont été obtenus avec des cristaux mixtes.

En 36, figurent des spectres obtenus en polarisation // et pour le coronène dispersé dans le PMMA. Dans la région $\Delta m = 2$ ces spectres sont typiques des molécules à symétrie ternaire pour lesquelles X = Y (E = O). En plus de H_{min}, il y a un seul champ de résonance Ho qui correspond au cas où le champ statique se trouve dans le plan de la molécule. Pour les transitions $\Delta m = 1$, qui ne sont pas portées sur la figure mais qu'on obtient facilement, il y a quatre raies : deux correspondant à Ho et deux autres à Hz.

2. Méthode de détermination des constantes à partir du spectre expérimental

a) On ne connait que H_{min} : le seul paramètre accessible est alors $D^{*2} = D^2 + 3E^2$. déterminé par la relation :

$$D^{*2} = \frac{3}{4}\left\{\delta^2 - (2g\beta H_{min})^2\right\}$$

Pour une symétrie au moins ternaire E = O donc $D^* = D$. Pour une molécule plane de symétrie inférieure D est souvent très supérieur à E et on a $D^* \# D$.

b) On obtient deux raies. Plusieurs cas peuvent se présenter :

- Polarisation // ou H_{min} et une raie du type I
  2 raies du type I
- Polarisation $\perp$ ou H_{min} et une raie du type II ou III
  tout arrangement deux à deux entre les raies du type I et celles du type III.

La difficulté est en fait d'identifier deux raies. Ph. KOTTIS et R. LEFEBVRE ont donné une analyse de ces cas en calculant les différentes valeurs de X, Y, Z, à partir des différentes paires possibles de champs de résonance.

c) On obtient un spectre complexe. Dans ce cas, l'identification des différentes raies devient plus facile puisqu'on a un nombre de possibilités limitées. Les relations fondamentales étant $X + Y + Z = O$.
et les relations du type (7)

Remarquons que ces relations peuvent s'écrire également sous la forme :

$$|X| = (6\,\delta)^{-1}\,(g\beta)^2\,({}^{III}H_x^2 - {}^{II}H_x^2)$$

$$|Y| = (6\,\delta)^{-1}\,(g\beta)^2\,({}^{III}H_y^2 - {}^{II}H_y^2) \qquad (10)$$

$$|Z| = (6\,\delta)^{-1}\,(g\beta)^2\,({}^{III}H_z^2 - {}^{II}H_z^2)$$

Avec un spectre complet comme celui du naphtalène on a donc là un moyen très commode de calculer X, Y, Z, ou D et E.

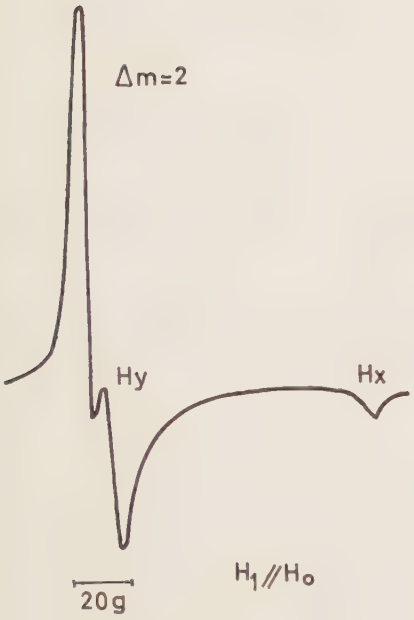
Remarquons qu'en principe les valeurs exactes des champs résonants II, III_{Hx} etc ... ne correspondent pas tout à fait aux extrema de la courbe dérivée première. Il y a un décalage de l'ordre de $\frac{1}{3}\lambda$($\simeq$ 1 à 3 gauss) du à l'intéraction hyperfine. En fait la mesure des champs magnétiques dans le domaine moyen 1000 à 4000 gauss ne peut guère être faite qu'à 3 ou 4 gauss près.

A moins d'obtenir des raies exceptionnellement larges ou complexes, on peut donc admettre qu'en prenant les valeurs des champs correspondant aux extrema de la courbe dérivée et pour valeur de g celle de l'électron libre ($g \simeq 2,0023$). On obtient les paramètres de splitting avec une précision suffisante (allant de quelques pour cent à quelques pour mille pour des raies $\Delta m = 1$ fines et intenses).

Remarque

La désignation des axes OX, OY, OZ est arbitraire et le spectre de résonance des triplets des molécules en solution ne change pas si on permute X, Y, Z, avec un changement de signe convenable. Il s'ensuit que les valeurs de D et E dépendent du choix des axes.

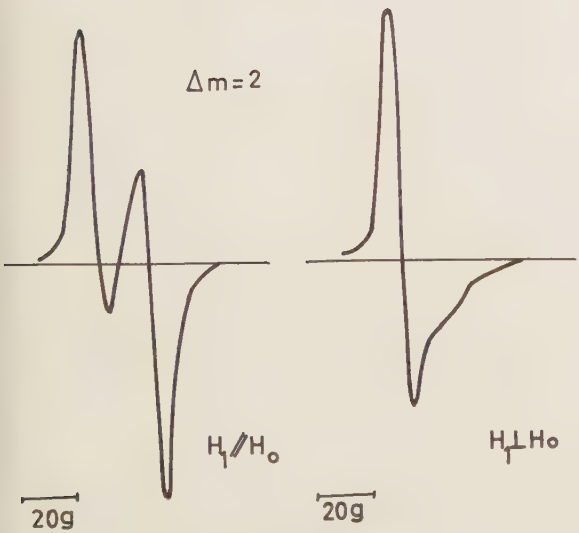
Des conventions ont cependant été faites pour faciliter la mise en équation et la présentation des résultats. D est la différence entre le niveau Z et le



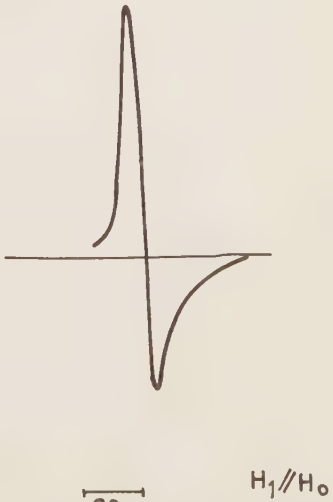
Naphtalène d_8

Naphtalène

Fig. 35 Transitions Δm=2 pour le triplet de naphtalène



Coronène dans P.MMA.



Phénanthrène

Fig. 36

milieu des deux autres niveaux. Ces deux niveaux X et Y étant séparés par 2 E, le signe de E change si on permute X et Y, on prendra donc X; Y > O ce qui entraîne Z < O.

Le signe absolu de D ne peut être déterminé que par l'étude d'un cristal au voisinage de 4°K. Dans le cas des solutions à la température de l'azote liquide ce signe ou celui de X, Y, Z n'influent pas sur le spectre. Dans le cas du naphtalène on prend donc X, Y > O, et Z < O, X < Y < Z . C'est-à-dire un axe OZ ⊥ au plan de la molécule. WASSERMAN adopte la convention D > 3E pour trois axes différents, et pour deux axes équivalents E = O, OZ est la troisième direction.

3. Résultats particuliers obtenus pour les molécules dispersées dans les plastiques.

De l'ensemble des résultats obtenus, nous détacherons les points suivants :

a) Durées de vie : L'étude par RPE des déclins de phosphorescence ne permet pas de relever d'anomalies par rapport à l'étude optique dont les résultats sont portés dans le tableau précédent de la fig. 38. Ces déclins sont parfaitement exponentiels et les durées de vie sont identiques par les deux méthodes.

L'étude en fonction de la température conduit à des résultats analogues et permet de mettre en évidence l'influence de la matrice et de ses variations de structure sur le temps de relaxation de l'état triplet de la molécule de soluté et sur son monde de désactivation (radiative ou non radiative).

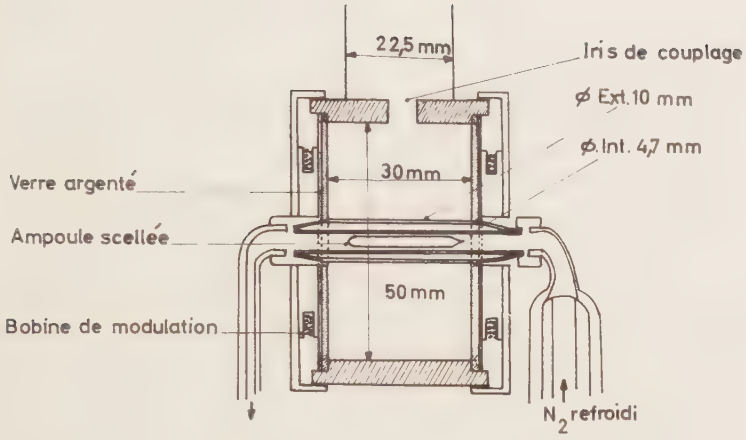
Nous ne détaillerons pas davantage cette question pour le moment. Dans le cadre du laboratoire N. TRUBLIN (55) a entrepris une étude plus complète du problème de la "stabilisation des états excités" à la suite des travaux de C. F. FORSTER (56) montrant l'influence prépondérante des liaisons secondaires ou chimiques existant entre la molécule phosphorescente et la matrice rigide.

b) Signaux de résonance. Deux paramètres sont rattachés à ces signaux:
- paramètre du "splitting" en champ nul,
- largeur de raie.

L'intensité des transitions $\Delta m = 1$ à 293°K est très faible et une première étude commode peut être faite en calculant $D^* = (D^2 + 3E^2)^{1/2}$ à partir de H_{min}. Comme on peut le voir sur le tableau 38 les valeurs de D^* pour les plastiques sont en bon accord avec les valeurs obtenues pour les verres organiques et les cristaux. Pour le naphtalène D^* est cependant supérieur aux deux autres valeurs. Pour les largeurs de raies, il y a variation plus nette caractérisée par un élargissement important du signal pour les plastiques.

Ces résultats sont en bon accord avec les résultats de W. A. YAGER (57) et ses coll. qui ont montré un effet de l'environnement sur la largeur des raies de résonance du diphénylméthylène (triplet fondamental) assez semblable à l'effet SHPOLSKII (58).

Il y a donc un effet de l'environnement sur les caractéristiques du signal de résonance du triplet. Il y a une variation des paramètres du splitting D



Cavité cylindrique utilisée pour la polarisation parallèle $H_1 // H_0$

Fig. 37

	D*		ΔH_{gauss}	
	P.MMA.	E.P.A.	P.MMA.	E.P.A.
Naphtalène	0,1063	0,1049*	15	11
Coronène	0,098	0,097	10	8
Phénanthrène	0,133	0,133	18	12

Caractéristiques de la transition $\Delta m=2$ $H_1 \perp H_0$

* Valeur donnée par Smaller J. Chem. Phys. 37, 1578 (1962)

Signal des radicaux du P.MMA. à 77°K
g=2

Fig. 38

et E et de la largeur de raie. Dans le PMMA on obtient rapidement une concentration importante de radicaux stables à la température ordinaire dont le signal est figuré en 38.

Ces espèces fortement paramagnétiques peuvent éventuellement modifier le couplage spin-orbite et donc influer également sur l'intensité de la phosphorescence.

c) Effet oxygène. La phosphorescence à la température ordinaire des échantillons de PMMA contenant des carbures aromatiques, diminue très rapidement si ces échantillons sont laissés à l'air. On interprète cet effet par la diffusion de l'oxygène au sein du plastique.

La diminution de l'intensité de phosphorescence peut être due à deux effets :

- diminution de la "viscosité locale" à la suite d'une rupture partielle des chaînes polymères par dégradation oxydante.
- extinction par les molécules O_2.

L'irradiation ultra-violette provoque l'apparition de radicaux libres qui donnent un signal complexe figuré en 38. Nous n'avons pas étudié en détail la cinétique de formation de ces radicaux mais d'une façon qualitative on peut dire que la présence des molécules phosphorescentes augmente la vitesse de formation de ces radicaux. Rappelons que dans les solutions alcooliques, il y a un phénomène de photo-sensibilisation qui détermine entièrement la photolyse du solvant.

Il y a donc trois possibilités de fixation pour les molécules O_2 :
- les radicaux libres qui conduisent à peroxydes du type - C - O - O.
- les molécules aromatiques
- les groupements - C = C -

A 77°K l'extinction de phosphorescence pour des échantillons saturés en O_2 est peu importante. il y a donc un effet prépondérant de la viscosité locale. En plus des ruptures de chaîne provoquées par l'irradiation il peut subsister au voisinage du soluté des molécules de monomère car la polymérisation thermique n'est jamais complète.

L'irradiation prolongée à température ordinaire conduit à une restauration partielle de la phosphorescence. Pour des concentrations suffisantes de radicaux il peut donc se produire une polymérisation partielle conduisant à une augmentation de la viscosité locale.

On peut également restaurer la phosphorescence en plaçant les échantillons en atmosphère d'hydrogène. La diffusion très rapide des molécules H_2 entraîne une expulsion de l'oxygène non engagé dans des combinaisons chimiques. Un effet identique est obtenu dans les cristaux d'acétate de cadmium. Il convient donc d'attribuer une partie du "quenching" à l'oxygène absorbé. En fait la chronologie et la filiation des différents phénomènes photochimiques faisant intervenir ou non l'oxygène et conduisant à l'extinction de la phosphorescence d'une molécule placée dans une matrice rigide, restent à établir. Des travaux dans ce sens se poursuivent activement au laboratoire.

d) Remarque. Nous avons tenté avec ce type d'échantillons de faire une étude de l'influence de la polarisation de la lumière incidente sur la forme des

$D^* = 0{,}156 \pm 0{,}002\ cm^{-1}$

$\Delta H = 20 \pm 1$ gauss

C_6H_6

ETAT TRIPLET du BENZENE

$H_1 \perp H_0$

$D^* = 0{,}156 \pm 0{,}002\ cm^{-1}$

$\Delta H = 12{,}5 \pm 1$ gauss

C_6D_6

Transition $\Delta m = 2$

Fréquence 9200 Mc/s T = 77°K

Fig. 39

spectres de résonance. Pour chaque champ résonant on a une orientation bien définie de la molécule par rapport à H_o. La transition $S_o \rightarrow S_1$ par laquelle on peuple le triplet est elle-même polarisée. Pour observer une résonance par exemple $\Delta m = 1$, Hz, il faudra donc que le vecteur lumineux soit parallèle au moment de transition de la molécule donc l'axe OZ est // à Ho. Nous n'avons obtenu de résultats nets avec ce type d'échantillons. Il y a une difficulté expérimentale importante : celle d'obtenir une transmission suffisante entre 250 et 300mμ avec les polariseurs classiques (signalons cependant que des résultats intéressants qui seront publiés par ailleurs viennent d'être obtenus au laboratoire avec une molécule très différente : la phénoxazine).

4. Conclusion. Bien que très résumée, cette étude des carbures aromatiques est pour nous d'un très grand intérêt. Elle nous a permis de pénétrer suffisamment dans le détail expérimental et théorique pour avoir un aperçu clair des possibilités de la méthode et des modalités d'application. Nous allons voir que le cas des acides aminés est en fait beaucoup plus difficile et que nous ne pourrons que poser les premiers jalons d'une étude analogue. Rappelons que pour les plastiques des études très récentes (59) (60) (61) viennent d'être publiées qui confirment bien nos premiers résultats obtenus sur cette question.

B. Cas des acides aminés

Rappelons tout d'abord que les acides aminés sont des produits de substitution du benzène et de l'indole. Il nous a donc paru intéressant de suivre les modifications éventuelles du spectre de RPE de l'état triplet lorsqu'on passe du carbure simple à l'acide aminé correspondant, en passant par des produits de substitution intermédiaires. Voici l'exemple d'une série :

Benzène

Toluène

phénol

phénylalanine

tyrosine

1) Cas du benzène

L'étude en RPE est rendue particulièrement délicate par le faible rendement de phosphorescence de cette molécule. Il est par ailleurs difficile de trouver des sources très puissantes dans le domaine des courtes longueurs d'onde ($\leqslant 260m\mu$) où se trouve la courbe d'absorption. Nous avons enregistré nos premiers signaux à peu près en même temps que SMALLER (55) et que Van der WAALS et de GROOT (86) et les valeurs de D^* trouvées concordent bien avec celles de ces auteurs. Avec la sensibilité actuelle de nos appareils, nous n'avons pas pu enregistrer que la transition $\Delta m = 2$ correspond à H_{min} (Fig. 39). Bien qu'ayant une augmentation importante de la durée de vie pour la benzène deutéré ($\tau_H \simeq 7s, \tau_D \simeq 13s$) la sensibilité reste insuffisante avec les solvants classiques et à 77°K.

φ-CH_3

$D^* = 0{,}177 \pm 0{,}002\ cm^{-1}$

$\Delta H = 77 \pm 3$ gauss

ÉTAT TRIPLET du TOLUÈNE

φ-OH

$D^* = 0{,}156 \pm 0{,}002\ cm^{-1}$

$\Delta H = 60 \pm 2$ gauss

ETAT TRIPLET du PHÉNOL

Transition $\Delta m = 2$

$H_{rf} \perp H_0$ Fréquence : 9200 Mc/s T = 77°K

Fig. 40

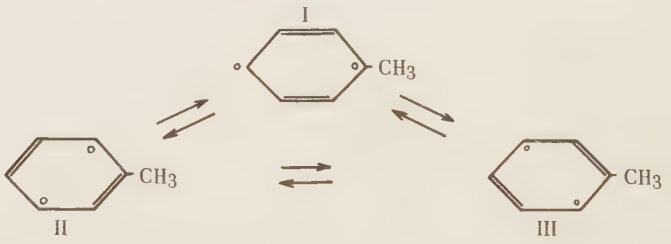
Van der WAALS et de GROOT ont pu obtenir ces mêmes spectres à 20°K en polarisation parallèle (87). La présence d'une raie unique les conduit à proposer une structure de l'état excité du type quinoïde plane :

En fait, le spectre expérimental obtenu devrait résulter d'un équilibre dynamique sur les trois formes. Le fait que l'on obtient ni le spectre des trois formes en équilibre ni le spectre d'une seule structure est en faveur d'une vitesse d'interconversion rapide de l'ordre de 10^{-9}s. qui reste cependant faible devant les fréquences vibrationnelles habituelles. Cette interprétation s'accorde bien avec les prédictions de LONGUET-HIGGINS et SALEM (88) et ceux de LIEHR (89). Par contre, elle n'est pas confirmée par les résultats spectroscopiques de LEACH et de ses collaborateurs (90) qui attribuent à la molécule excitée à l'état triplet une symétrie parfaitement hexagonale.

2) Toluène-Phénol

L'introduction d'un groupement CH_3 sur le naphtalène n'a que peu d'influence sur le spectre de résonance de l'état triplet. Le résultat est très différent dans le cas du benzène. Sur la Fig. 40 est reporté le spectre du toluène qui se caractérise par un élargissement important et l'apparition d'une structure. Il est remarquable de constater que cette structure se retrouve dans les spectres de résonance en polarisation parallèle donnés par Van der WAALS et de GROOT.

Il est donc raisonnable d'admettre qu'à 77°K, il y a un équilibre entre les trois structures possibles.



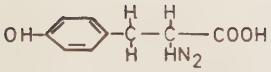
La forme I étant la structure préférentielle qui subsiste à basse température. Effectivement à 20°K, les auteurs précédents obtiennent un spectre où ne subsiste pratiquement qu'une seule raie.

Le spectre du phénol ne diffère pas sensiblement de celui du toluène.

Il semble également y avoir plusieurs formes en équilibres malgré le caractère nettement plus électropositif de substituant qui devrait conduire à une structure préférentielle. Il faut dire que l'utilisation de produits deutérés ou substitués différemment n'a pas permis jusqu'à maintenant d'apporter des précisions définitives sur la structure de ces molécules benzéniques.

3) Phénylalanine - Tyrosine

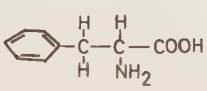
L'allongement de la chaîne de substitution et l'introduction de groupements fortement polaires ne conduit pas à des changements importants dans



$D^* = 0{,}160 \pm 0{,}002\ cm^{-1}$

$\Delta H = 15 \pm 1$ gauss

ETAT TRIPLET de la TYROSINE



$D^* = 0{,}177 \pm 0{,}002\ cm^{-1}$

$\Delta H = 63 \pm 2$ gauss

ETAT TRIPLET de la PHÉNYLALANINE

Transition $\Delta m = 2$

$H_{rf} \perp H_0$

Fréquence : 9200 Mc/s T = 77° K

Fig. 41

l'allure du spectre de résonance pour la phénylalanine (Fig. 41). Nous avons cependant vu que les résultats de fluorescence conduisaient à admettre une interaction importante entre l'état singulet excité du cycle et les groupements terminaux. Pour ce qui est de l'état triplet il faut donc admettre une indépendance relative du cycle vis à vis de ces groupements, au moins en ce qui concerne la description de la structure électronique en terme de densité de spins.

Par contre le changement de spectre est remarquable lorsqu'on passe au cas de la tyrosine. Puisqu'on obtient dans ce cas une raie unique sans structure qui se rapproche pour la forme de celle du benzène. La valeur de D^* est également remarquable puisque c'est une des plus élevées que nous ayons obtenues. Rappelons que pour des produits de substitution différents tels que l'acide benzoique ou l'aniline, le déplacement de la raie de résonance se fait au contraire dans le sens des champs croissants traduisant une diminution de la constante de couplage. Etant donné les intensités faibles des signaux obtenus pour ces acides aminés, il ne nous a pas été possible de détecter les transitions $\Delta m = 1$ ou de travailler en polarisation parallèle. Le cas des dérivés indoliques est par contre plus favorable.

4) Indole - Tryptophane

La bonne solubilité de l'indole dans les solvants organiques classiques et le rendement quantique de phosphorescence élevé permettent une étude RPE plus commode. Rappelons que de grandes précautions devront cependant être prises pour éviter la présence d'oxygène.

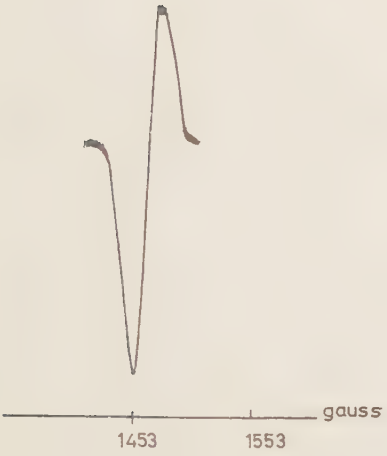
Une expérimentation commode peut également être réalisée avec les échantillons d'indole incorporé dans le polyméthylmétacrylate. Avec une lampe HBO 500 watts, nous avons réussi à obtenir un spectre complet en polarisation perpendiculaire comportant la transition $\Delta m = 2$ (H_{min}) et les six transitions $\Delta m = 1$. Le signal très intense des radicaux libres produits par la photosensibilisation des solvants se superpose à la transition située vers 3300 gauss. Pour établir la forme de cette raie, nous avons utilisé un échantillon de PMMA et fait la différence des deux spectres point par point. La détermination des paramètres X, Y, Z et D, E, peut donc être faite en utilisant les trois groupes de deux raies des transitions $\Delta m = 1$, selon les formules (10).

Nous n'avons pas fait ici de corrections en fonction de la largeur de raie, étant donné la définition des raies et la détermination des champs magnétiques ($\pm$ 4 gauss) donnant certainement une erreur très supérieure à cette correction. En prenant les valeurs des champs correspondant aux extrema pour H_X^{II}, H_X^{III}, etc ..., on trouve trois coefficients :

$A = 0,0112\ cm^{-1}$ ($\pm 0,0002$)
$B = 0,0687$ " "
$C = 0,0803$ " "

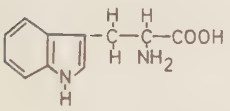
Rappelons que la numérotation des axes est arbitraire. Ayant ici une molécule plane mais sans aucune symétrie on peut supposer une valeur de E élevée. En prenant

$|X| = A = 0,0112\ cm^{-1}$
$|Y| = C = 0,0803\ cm^{-1}$ $\quad D = 0,1033\ cm^{-1}$
$|Z| = B = 0,0687\ cm^{-1}$ $\quad E = 0,0458\ cm^{-1}$



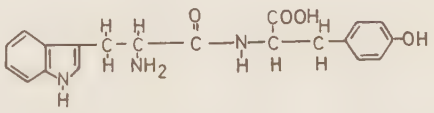
$D^* = 0{,}125 \pm 0{,}002\ cm^{-1}$

$\Delta H = 24 \pm 1$ gauss



ETAT TRIPLET du TRYPTOPHANE

Les valeurs de D^* & ΔH sont celles du TRYPTOPHANE



ÉTAT TRIPLET du TRYPTOPHYL TYROSINE

TRANSITION $\Delta m = 2$

$H_{rf} \perp H_0$ Fréquence 9200 Mc/s $T = 77°K$

Fig. 42

On peut vérifier la valeur de H_{min} au moyen de la formule :

$$H_{min}^{2} = (2g\beta)^{-1} \left[\delta^{2} + 4\,(XY+XZ+YZ) \right]^{1/2}$$

La valeur calculée est : H_{min} = 1432 gauss
La valeur observée est : H_{min} = 1430 gauss

Nous voyons donc que sans faire de corrections, les vérifications restent excellentes. On peut donc comparer la valeur très élevée de E obtenue, à celle du phénanthrène (suivant les mêmes conventions) qui est de 4.10^{-2} cm^{-1} également, alors que pour les autres molécules phosphorescentes la valeur est de l'ordre 1 à $1,5.10^{-2}$ cm^{-1}.

Il faut également remarquer la variation de D^{*} avec le solvant :
- indole dans EPA $D^{*} = 0,0127$ cm^{-1}
- indole dans PMMA $D^{*} = 0,0131$ cm^{-1}

variation qui est bien en accord avec les résultats obtenus pour les carbures aromatiques.

Lorsqu'on passe au 3-méthylindole (scatole) il n'y a pratiquement pas de variation du signal de la transition $\Delta m = 2$ et la valeur de D^{*} est celle de l'indole dans l'EPA.

Pour le tryptophane, il devient très difficile de détecter les transitions $\Delta m = 1$ étant donné la faible solubilité du composé dans les solvants utilisés. Les résultats sont les suivants : transition $\Delta m = 2$. En polarisation perpendiculaire, on obtient une raie simple tout à fait analogue à celle de l'indole et conduisant à

$D^{*} = 0,0126$ cm^{-1} ($\pm$ 0,0002)

En polarisation parallèle, nous avons obtenu une raie unique qui conduit à une valeur de $D^{*} = 0,0124$ légèrement inférieure à la précédente. La sensibilité insuffisante ne nous a pas permis d'obtenir les transitions correspondant à H^{I}_{X}, H^{I}_{Y}, et H^{I}_{Z}.

Transition $\Delta m = 1$. En solution organique nous sommes à la limite de sensibilité et nous n'avons pu détecter qu'une raie vers 2100 gauss à 9200 Mc/s. Ce qui semble indiquer une correspondance intéressante entre les spectres du tryptophane et de l'indole.

Les valeurs trouvées pour l'ensemble de ces composés sont en bonne correspondance avec celles publiées récemment par SMALLER (91). Une amélioration en cours de nos conditions d'expérimentation nous permettra d'obtenir avec plus de précision les différentes transitions et d'étudier l'effet de la lumière polarisée.

5) Durées de vie

Le montage précédemment décrit permet d'enregistrer simultanément les déclins de la phosphorescence et du signal RPE. Aux erreurs dues au manque de sensibilité en RPE près, les deux déclins sont rigoureusement identiques comme le montre la figure 44.

Nos résultats sont donc en contradiction avec ceux de SHIGA et PIETTE (48) qui trouvent des valeurs très différentes pour ces durées de vie. Mais ces

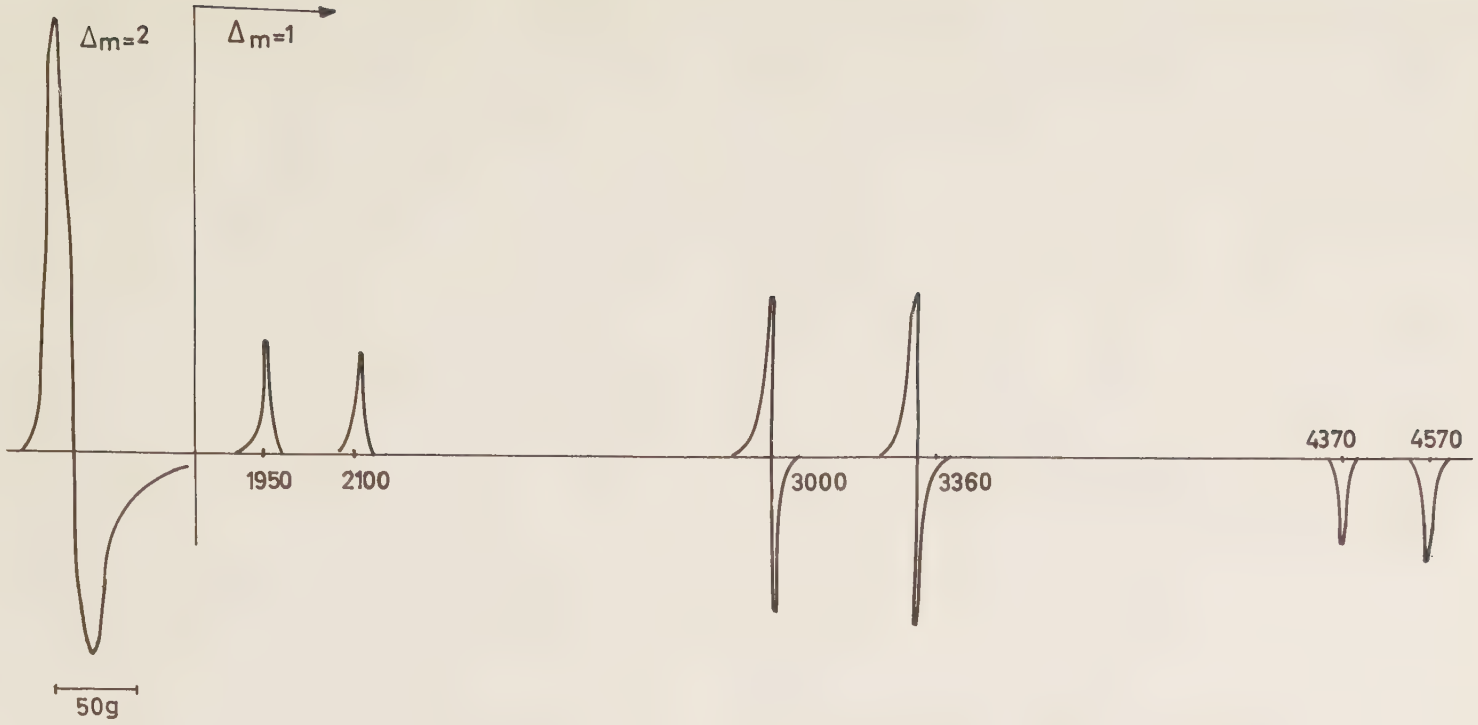


Fig. 43 Résonance de l'état triplet de l'Indole dans le P.MMA. à 77°K

auteurs travaillent avec des solutions excessivement concentrées en HCL (6N) et non dégazées. Nous avons vu que dans le cas des composés indoliques, ces conditions expérimentales sont inacceptables si on veut éviter une dégradation presque complète des solutions.

En RPE, les durées de vie obtenues sont : tryptophane $\simeq 6,7$s
phénylalanine $\simeq 5,9$s
tyrosine $\simeq 2,9$s

6) Combinaisons d'acides aminés

Nous avons débuté une expérimentation sur les dipeptides, polypeptides et protéines pour situer les signaux de résonance des acides aminés lorsqu'ils sont engagés dans une combinaison par l'intermédiaire de la liaison peptidique - CONH. Les difficultés viennent des solubilités très faibles de ces composés dans les solvants organiques. On ne peut évidemment enregistrer que les transitions $\Delta m = 2$ en polarisation perpendiculaire. Les résultats présentent un excellent parallélisme avec ceux de l'optique. On peut les résumer ainsi :

a) pour les dipeptides, il n'y a pas de modification appréciable de la forme et de position du signal par rapport au cas de l'acide aminé isolé.

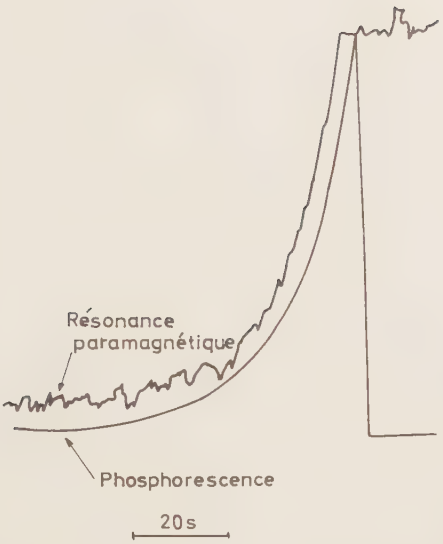
b) pour les oligopeptides, on ne trouve que le signal de la tyrosine ou du tryptophane auquel correspond la phosphorescence unique que nous avons décrite précédemment. A titre d'exemple est porté sur la Fig. 44 le signal obtenu avec la tryptophyltyrosine qui s'identifie parfaitement à celui du tryptophane. L'existence de ce signal unique et de la phosphorescence correspondante est donc bien en faveur d'un transfert d'énergie dans le sens tyrosine → tryptophane.

c) pour les protéines à l'état solide telles que l'albumine d'oeuf, la sérumalbumine bovine et la sérumalbumine humaine, on enregistre à 77°K un signal $\Delta m = 2$ relativement intense dont la forme et la position correspondent au signal du tryptophane. Là aussi les résultats confirment entièrement ceux de l'optique. Il convient cependant de remarquer que la faible émission de la tyrosine obtenue avec une excitation monochromatique convenable (Fig. 29) ne laisse guère la possibilité d'obtenir le signal RPE correspondant.

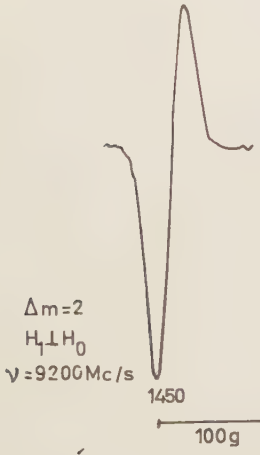
Dans l'état actuel de l'expérimentation, la RPE ne permet donc pas d'enregistrer de modification essentielle dans la structure électronique décrite en terme de densité de spins, pour les acides aminés engagés dans ces combinaisons. Ce résultat s'accorde bien avec le fait que les groupements terminaux ont une interaction faible avec l'état triplet du cycle contrairement à ce qui se passe pour l'état singulet. Mais une étude plus précise, en particulier de largeurs de raies, devrait conduire à une meilleure compréhension de l'influence de l'environnement dont on a vu qu'elle modifiait certainement le couplage spin-orbite et d'une façon plus générale le mode de désactivation.

7) Transfert d'énergie

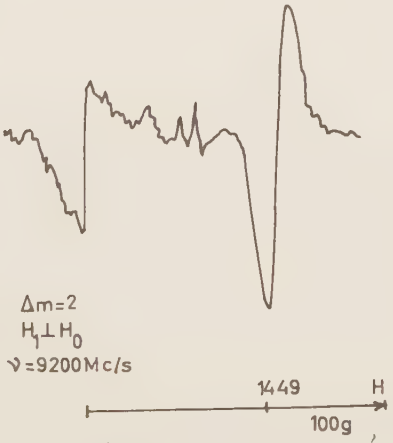
L'existence de signaux de RPE bien séparés quant à la position dans le champ est un facteur favorable pour l'étude du transfert de l'énergie en solution rigide. Lorsque les bandes d'excitation sont bien séparées comme c'est le cas pour les carbures armoatiques, il est possible de reproduire les expériences de transfert triplet→ triplet bien connues en optique.



Enregistrements simultanés des déclins optique & magnétique de l'état triplet du tryptophane.



État triplet de l'albumine d'œuf



Résonance d'un mélange Tyrosine - Tryptophane

Fig. 44

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus concorde bien avec ceux de TERENIN et ERMOLAEV (92) et ceux de FARNER et ses coll. (93) et de SIEGEL et EISENTHAL (94) en RPE. Nous n'y reviendrons pas. Dans ce cas des acides aminés, la coïncidence des pics d'absorption de la tyrosine et du tryptophane rend l'expérience très délicate. D'autant plus que nous n'opérons pas en lumière monochromatique, étant donné la faible intensité des signaux de la tyrosine. Les résultats essentiellement qualitatifs sont en faveur d'un transfert tyrosine → tryptophane. Ils se résument ainsi :

a) l'addition du tryptophane à une solution de tyrosine conduit systématiquement à une diminution de l'intensité du signal de RPE de triplet de ce dernier.

Pour des solutions équimoléculaires (concentration totale $\simeq 4.10^{-2}$ M / litre) on peut dire que compte tenu :

- des coefficients d'extinction moléculaire,
- des intensités relatives de phosphorescence,

la diminution du signal de la tyrosine est de l'ordre de 30%. Cette valeur est la moyenne obtenue sur un grand nombre d'expériences au cours desquelles nous nous sommes efforcés de rendre les conditions de refroidissement reproductibles. Conditions qui déterminent presque entièrement les résultats.

b) les limites étroites de concentration dans lesquelles nous devons travailler ($C \simeq 0{,}02$M/litre) rendent une étude quantitative en fonction de la concentration très difficile. En première approximation on peut admettre que la durée de vie du donneur ainsi que la forme exponentielle du déclin ne sont pas modifiées. Ce résultat est en bon accord avec celui obtenu par ailleurs sur les carbures.

8) Conclusion

L'étude théorique et expérimentale de la résonance de l'état triplet des carbures aromatiques a été une étape essentielle de notre travail. Elle nous a permis d'aborder l'étude plus difficile des molécules d'intérêt biologique. Nous avons pu donner les caractéristiques essentielles des signaux de résonance des acides aminés en les comparant aux carbures simples dont ils sont dérivés. Les résultats obtenus sur la durée de vie et le transfert sont en bon accord avec les résultats de l'étude optique. Une amélioration de la sensibilité nous permettra de préciser des données fondamentales sur la structure électronique (anisotropie du tenseur de couplage) et l'influence de l'environnement. Nous espérons également que la mise au point de nouveaux procédés de solubilisation (plastiques et cristaux mixtes) nous permettra d'étudier la structure hyperfine et l'orientation des moments de transition de la molécule (en parallèle avec des expériences de phosphorescence polarisée). Il faut également rappeler que l'obtention commode de polymères de structure hélicoïdale laisse espérer une étude de la résonance de l'état triplet conçu sous forme d'exciton moléculaire. Van der Walls et de Groot viennent d'obtenir dans ce domaine des résultats particulièrement intéressants avec des molécules polycycliques (87). Nous allons maintenant aborder un aspect très différent des propriétés du triplet, celui de la photochimie en solution à l'état solide.

4ème Partie - ETUDE DE LA PHOTOCHIMIE DES POUDRES MICROCRISTALLINES ET DES SOLUTIONS

Au cours des chapitres précédents, nous nous sommes plus spécialement intéressés à la désactivation par luminescence ou par transfert, à partir des premiers états excités singulet et triplet. Il nous reste maintenant à envisager le cas où la désactivation s'accompagne d'une transformation chimique de la molécule d'acide aminé. Transformation qui se traduit généralement par l'apparition de radicaux qu'il est possible d'étudier par RPE.

On conçoit l'intérêt d'une telle étude si on se reporte aux travaux de B. T. ALLEN et D. J. E. INGRAM (62) sur l'irradiation ultra-violette des protéines. La production plus ou moins réversible de radicaux dans des échantillons de mélanine, d'albumine, etc... avait conduit ces auteurs à admettre des propriétés "supra-moléculaires" pour ces protéines, propriétés qui s'accordaient assez bien avec une théorie générale de la "semi-conductivité". Les arguments essentiels étaient basés sur la réversibilité des signaux de RPE obtenus par une irradiation à 3650 Å et sur l'impossibilité de détecter des signaux avec les acides aminés isolés. En fait, nous allons voir qu'une étude plus poussée du phénomène donne des résultats nettement plus complexes et qui ne conduisent pas aussi rapidement à l'hypothèse de la semi-conductivité.

III. 4. A. ETUDE DE LA PHOTOCHIMIE DES ACIDES AMINES EN SOLUTION ORGANIQUE

Il s'agit donc d'identifier les espèces moléculaires nouvelles provenant de la désactivation, en supposant qu'aux températures les plus basses que nous pouvons atteindre (77°K) leur durée de vie est suffisante pour permettre une étude par spectroscopie optique ou par RPE. D'une façon générale les photoproduits peuvent être :

- des formes isomères
- des formes tautomères
- des radicaux non chargés provenant d'une réaction de photo-dissociation
- des ions provenant d'une réaction de photo-ionisation
- des ions radicaux provenant d'une réaction de photo-oxydation ($A \rightarrow A^+ + e^-$).

Dans la pratique, on désigne très souvent par photo-ionisation, l'éjection d'un électron de la molécule; pour éviter toute ambiguité, il semble plus simple d'employer le terme de photo-éjection.

Pour les acides aminés, les processus les plus probables sont la photodissociation et aussi comme nous allons le voir la photo-éjection.

1) Photolyse des solutions alcooliques

a) E. P. A.

Nos toutes premières études ont été faites dans ce solvant composé de : 5 parties d'éther, 5 parties d'isopentane, 2 parties d'alcool éthylique. Il a en

effet l'avantage de donner des verres excellents. La solubilité des acides aminés dans l'EPA est très faible : $< 10^{-5}$M/litre; elle est due à la portion alcoolique. Pour augmenter cette solubilité on peut ajouter du HCL sec. (10^{-3} à 10^{-2} M/Litre); ce qui ne modifie pas d'une façon essentielle les caractéristiques spectrales de l'émission et les phénomènes photochimiques.

L'irradiation d'une solution : EPA + HC1 + Tryptophane, par une HBO 200 à travers un filtre à acide acétique, pendant 5 minutes, fait apparaître un signal vers g = 2 figuré en 46. Dans les mêmes conditions, le solvant seul ne donne aucun signal. Nous avions d'abord interprété ce signal comme étant celui d'un radical instable du soluté (63). Les deux autres acides aminés : tyrosine et phénylalanine, donnaient en effet des résultats peu reproductibles dus à la solubilité très faible et difficile à contrôler. Par contre, l'emploi d'autres molécules tels que des dérivés du triphénylméthane ou des amines aromatiques secondaires ou tertiaires permet d'obtenir un résultat identique.

Dans tous les cas, si on prolonge l'irradiation, le signal se structure et il apparaît la raie à 5 pics caractéristique du radical $CH_3\dot{C}HOH$ de l'alcool éthylique. De la même façon, si on augmente la proportion d'alcool dans le mélange le signal du $CH_3\dot{C}HOH$ apparaît très rapidement au profit du signal précédent à 2 pics. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de SHIGORIN et ses coll. (64) sur la photosensibilisation des alcools par des molécules phosphorescentes. Une solution de triphénylamine (10^{-3}M/Litre) dans l'isopentane contenant 0,4% d'alcool donne, sous irradiation, le même signal dissymétrique à 2 pics que nous obtenons dans l'EPA normal.

En accord avec les travaux de SR. J. SULLIVAN et W. S. KOSKI (65) sur la photolyse de l'éthanol à 77°K, nous attribuerons ce signal dissymétrique à deux pics au radical ethoxy : $C_2H_5\dot{O}$. Les conditions de formation et d'existence de ce radical dépendent :

- de la composition du solvant,
- de la concentration du soluté,
- de la température,
- de l'irradiation,
- du degré d'évolution de la solution au cours du temps.

On l'obtient :

1) pour des concentrations de tryptophane très faibles $< 10^{-5}$M/Litre et pour des proportions d'alcool allant jusqu'à 20%,
2) pour des concentrations plus élevées d'un soluté tel que la triphénylamine, la proportion d'alcool ne doit guère dépasser 1%,
3) lorsqu'on élève la température de 88°K à 120°K pour faire disparaître les autres radicaux $CH_3\dot{C}HOH$, $\dot{C}HO$, $\dot{C}H_3$.
4) si on laisse évoluer la solution pendant quelques heures, il y a des réarrangements conduisant au radical le plus stable qui est : $C_2H_5\dot{O}$. Les solubilités trop faibles obtenues avec l'EPA pour travailler en RPE et la difficulté de faire des cinétiques nous ont conduit à utiliser des solvants contenant 50 à 80% d'alcool ou même des alcools seuls.

b) Méthanol

La solubilité de nos trois acides aminés dans le méthanol seul est nettement meilleure que dans l'EPA en particulier pour le tryptophane ($\simeq 10^{-4}$M/Li-

tre). On peut l'améliorer en ajoutant du HCL sec. Avec l'alcool seul, il est possible d'obtenir des verres transparents à 77°K à peu près une fois sur deux. Pour éviter le craquelage de ces verres, il est plus commode de rajouter 20 à 30% d'éther. De plus, du point de vue de la photochimie, il n'y a pas de modifications. Les résultats qui sont portés sur la Fig. 45 s'accordent parfaitement avec ceux de SMALLER (66) qui a étudié la photosensibilisation du méthanol par l'indole. On peut les résumer ainsi :

1) l'introduction d'un soluté phosphorescent tel que le tryptophane à des concentrations allant de 10^{-4} à 10^{-2}M/Litre augmente la quantité de radicaux formés à partir du solvant de 5 à 10 fois.

2) Dès les premières secondes d'irradiation, il apparaît un signal à 3 pics non entièrement résolu caractéristique du radical $\dot{C}H_2OH$. Lorsqu'on passe de 87°K à 97°K, la structure du signal se modifie légèrement en laissant au centre du signal un singulet étroit bien marqué. A 110°K, le signal a presque disparu. Il reste une raie dissymétrique et non résolue, qu'il est possible d'attribuer à la formation intermédiaire de peroxydes. Nous ne sommes en effet jamais certain d'éliminer entièrement l'oxygène au cours d'un dégazage comportant habituellement quatre ou cinq cycles (refroidissement à 77°K+ réchauffement jusqu'au début de fusion sous vide).

3) Si on prolonge l'irradiation, il apparaît des signaux supplémentaires et que l'on attribue aux radicaux $\dot{C}H_3$ et $\dot{C}HO$. Une élévation de température de 10° conduit à la disparition presque complète de $\dot{C}H_3$ (ce radical est très stable à 4°K). A 110°K, il ne subsiste qu'une raie non résolue et dissymétrique analogue à celle obtenue précédemment provenant probablement de peroxydes formés avec l'oxygène résiduel.

4) SMALLER a montré qu'il y avait une relation quantitative entre la concentration instantanée de triplets et le nombre de radicaux formés dans le cas de l'indole. Le transfert triplet-triplet benzophénone→indole lui a permis en outre, de montrer d'une façon univoque l'intervention de l'état triplet dans la sensibilisation. Nous allons pouvoir avec l'éthanol donner des arguments supplémentaires à cette assertion.

c) Ethanol

Notre choix définitif s'est porté sur l'éthanol. Les solubilités obtenues sont suffisantes et pour des durées d'irradiation de 5 à 10mm, il se forme presque exclusivement le radical $CH_3\dot{C}HOH$, ce qui rend les cinétiques plus commodes à étudier. De grandes précautions devront cependant être prises pour éviter la présence d'aldéhyde qui donne avec des composés indoliques des complexes qui se dégradent irréversiblement à la lumière. Comme précédemment, les résultats les plus nets sont obtenus avec le tryptophane (Fig. 46).

1) au début de l'irradiation le radical formé à partir du solvant est : $CH_3\dot{C}HOH$. Ce radical est stable au cours du temps. Par élévation de température on a une diminution du signal et, dans la zone 110-90°K, il subsiste un signal assez voisin de celui de $C_2H_5\dot{O}$. Mais ce signal peut également provenir de peroxydes fermés à partir de l'oxygène résiduel. Pour des intensités d'irradiation faibles (HBO 200), il apparaît pour des concentrations faibles de soluté dans les premières secondes, un singulet étroit qui se superpose au signal de $CH_3\dot{C}HOH$. Bien que les conditions d'expérimentation soient diffé-

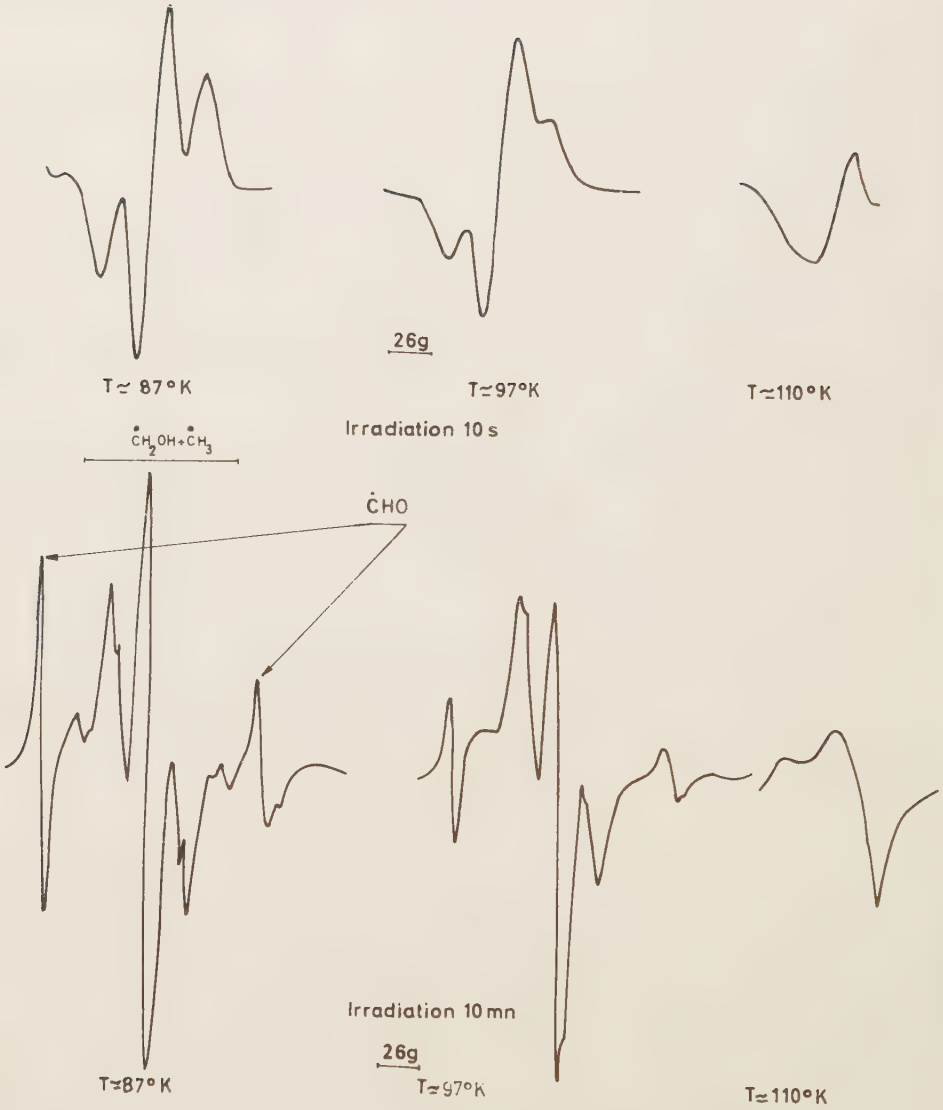


Fig. 45 Résonance des radicaux produits par photolyse du méthanol contenant du tryptophane.

rentes, on ne peut manquer de rapprocher ce résultat de ceux de C. CHACHATY (67) qui réussit à mettre en évidence un électron solvaté dans des verres d'éthanol irradiés aux γ à 77°K.

L'étude de la photo-éjection d'électrons du soluté dans des solvants organiques semblent, dans notre cas, très difficile. La réaction photochimique essentielle est la formation de radicaux à partir du solvant et elle masque les autres phénomènes. C'est pourquoi nous nous sommes orientés pour l'étude de la photo-éjection vers des milieux très différents tels que l'acide borique. Ce qui permettra de préciser les facteurs intervenant pour les solutions alcooliques par exemple : la composition du solvant, la concentration du soluté, les temps d'irradiation, la monochromaticité de la lumière incidente.

2) Pour des irradiations plus prolongées, le signal devient complexe, il y a formation d'autres radicaux : $\dot{C}H_3$, $\dot{C}HO$ et peut être aussi $C_2H_5\dot{O}$. Pour des durées de l'ordre de 30 minutes, la photolyse propre du solvant n'est plus négligeable et il y a en particulier la formation de radicaux éthyl par les radiations centrées autour de 250mμ (ces radiations représentent cependant moins de 1% de l'émission de la HBO 200 dans l'ultra-violet).

2) Mécanismes de la photolyse

a) Photolyse du soluté

Avec les temps d'irradiation donnés précédemment et dans les solvants organiques, il n'est pas possible de mettre en évidence à 77°K un signal de résonance provenant du soluté. Rappelons que dans la zone 250-300mμ, la HBO 200 émet des raies à : 275 - 280 - 289 - 297 - 302 - 313mμ dont les intensités relatives sont : 1 2 8 18 26 34 (l'intensité à 365mμ est de l'ordre de 65).

Donc, même pour la tyrosine et le tryptophane dont les max. d'absorption sont voisins de 280mμ, on a une intensité lumineuse faible. La photolyse des alcools montre cependant que l'émission dans la zone 250-270mμ peut être suffisante pour produire une quantité de radicaux détectables après 30 minutes.

Après une sensibilité de l'appareil évaluée à 5.10^{12} spins, il faut donc admettre que la photolyse propre du soluté n'est pas supérieure à 1% au cours de l'une de nos mesures.

Les irradiations prolongées ou répétées conduisent néanmoins à une dégradation partielle du soluté se traduisant par la formation irréversible de produits colorés (rose) pour le tryptophane (5 à 10% pour une heure d'irradiation continue). Cette dégradation dépend essentiellement de la qualité de l'alcool (présence d'aldéhyle), de la quantité d'oxygène restant après dégazage et de la quantité de HCl rajouté : (qui favorise la décomposition).

L'emploi de lumière monochromatique permettrait d'opérer avec beaucoup plus de sécurité. Pour obtenir une sensibilité suffisante en RPE, il faut employer des sources très puissantes : lampes au mercure ou au xénon de 900W à 2000W et disposer d'un système de monochromation adéquat (arrêt des I. R., protection des surfaces réfléchissantes). Nous étudions actuellement ce problème ainsi que celui des flash permettant d'obtenir des populations d'états excités élevées dans un temps court.

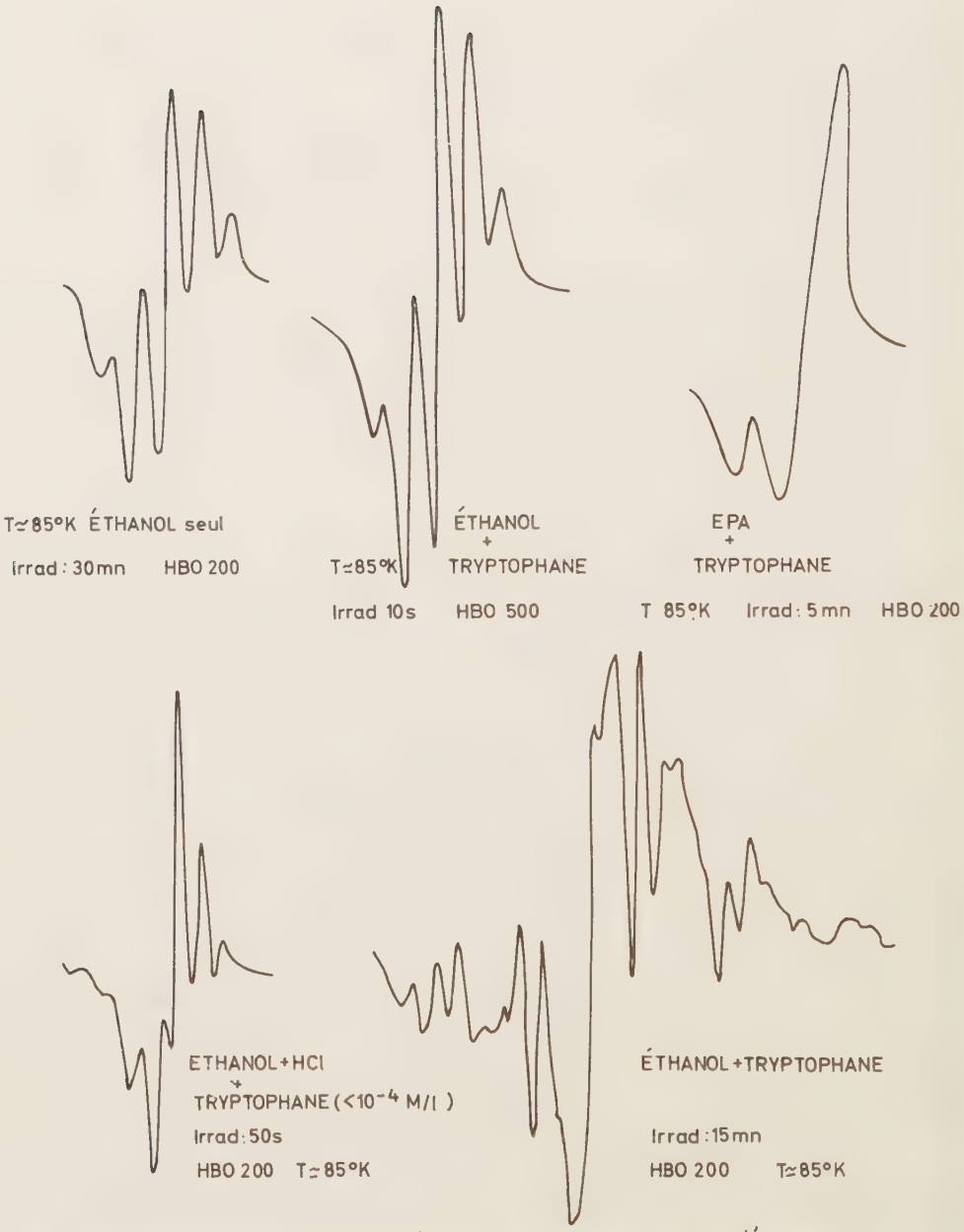


Fig. 46 Résonance des radicaux produits par photosensibilisation de l'ÉTHANOL

b) Intervention du triplet. Mécanisme biphotonique

1) Position du problème. La photolyse du méthanol ou de l'éthanol avec des rendements analogues à ceux obtenus précédemment nécessiterait l'emploi de sources très énergétiques dont l'émission est $\leqslant 253,7 m\mu$. Il ne semble pas commode d'expliquer le gain obtenu en ajoutant un soluté phosphorescent par une série de réactions secondaires. La photolyse propre des acides aminés excités dans la bande d'absorption de l'ultra-violet proche est faible (68). Nous avons vu d'autre part que nos réactions sont réversibles quant au soluté. L'oxygène n'existe dans nos solutions qu'à l'état de traces. Il convient dont de faire intervenir un ou plusieurs états excités du soluté :

2) Etat singulet. On peut envisager la formation d'un complexe excité "soluté-solvant" dont la désactivation se fait :
   - soit par la phosphorescence du soluté,
   - soit par la production de radicaux dans le solvant.

   La corrélation que nous établirons entre la concentration instantanée de triplets et la vitesse de formation des radicaux ainsi que les expériences de sensibilisation avec transfert d'énergie triplet-triplet contredisent fortement cette hypothèse.

3) Etat triplet. A. N. TERENIN (69) et ses coll. ont montré que la déshydrogénation des alcools par sensibilisation avec des amines secondaires ou tertiaires faisait intervenir obligatoirement l'état triplet du soluté. Ils effectuent une extinction de phosphorescence de ce soluté à l'aide d'un transfert triplet-triplet (exemple triphénylamine → naphtalène) et enregistrent la disparition relative de la sensibilisation. De la même façon, l'ensemble des travaux de SHIGORIN et de ses collaborateurs (70) (71) est en faveur du passage par l'état triplet du soluté. Leurs études de cinétiques (irradiation alternée, luminescence), montre qu'il y a une relation étroite entre la concentration en triplets et la vitesse de formation des radicaux.

L'absorption sur des gels de silice leur permet d'enregistrer les signaux de $\dot{H}$ et confirme la déshydrogénation de l'alcool.

Les études en fonction de l'intensité lumineuse et de la longueur d'onde d'excitation les conduisent à proposer un mécanisme à deux photons. Un tel mécanisme est proposé également par J. JOUSSOT-DUBIEN pour la photo oxydation de carbures aromatiques dans l'acide borique (73).

Nous avons fait (74) une étude cinétique de la vitesse de croissance $\frac{d\,R}{dt}$ des radicaux $CH_3\dot{C}HOH$ en fonction de la concentration instantanée des triplets du tryptophane n_t.

Les courbes obtenues sont figurées en 47. Nous voyons qu'il y a une bonne correspondance entre $\frac{dR}{dt}$ et n_t. L'intensité lumineuse est faible, et on peut écrire en première approximation.

$$R = C \int_o^t n_o \left(1 - e^{\frac{t}{\tau'}}\right) dt.$$

où n_o est la concentration stationnaire de triplets et τ' la constante de temps ($\simeq$ 7s) qui est d'ailleurs voisine dans les conditions d'expérimentation caractérisées par C, du τ du tryptophane. Pour des temps suffisamment longs la courbe $R = f(t)$ est une droite dont l'abscisse à l'origine est τ'.

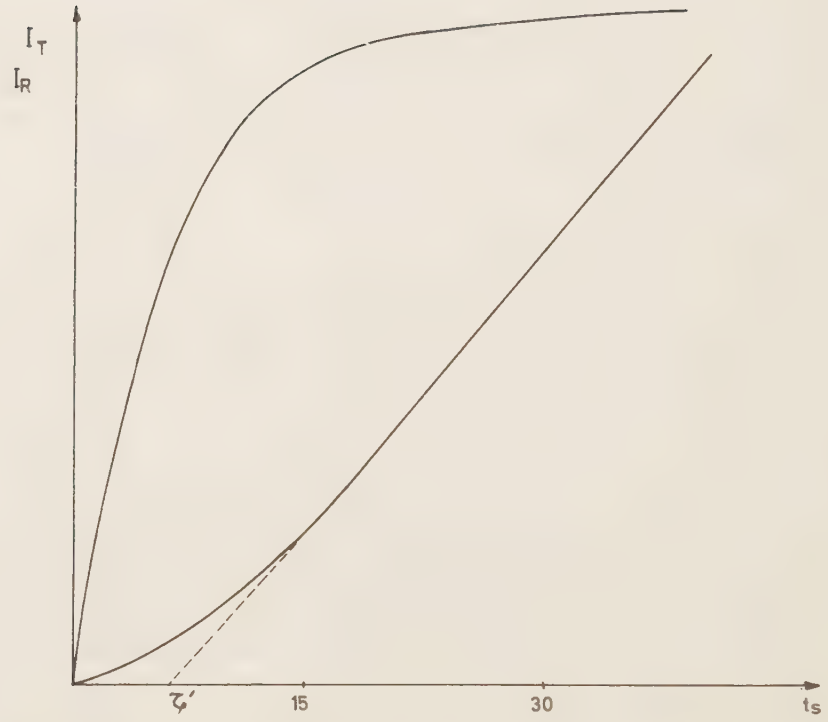


Fig. 47 Relation entre le peuplement de l'état triplet du soluté & la vitesse de formation des radicaux dans le solvant

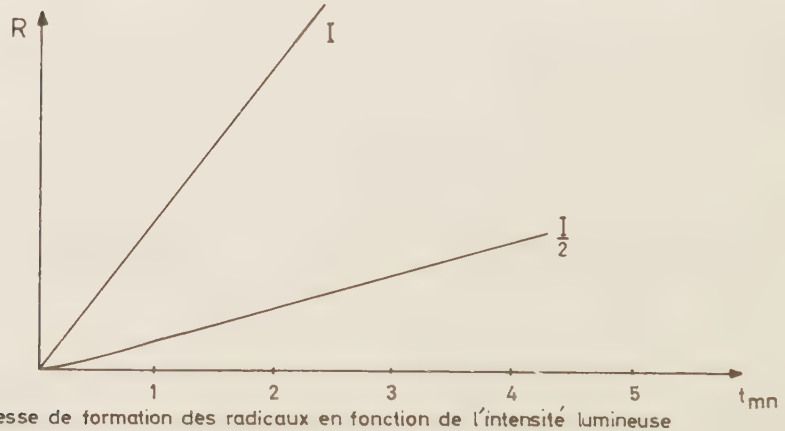


Fig. 48 Vitesse de formation des radicaux en fonction de l'intensité lumineuse

Remarques

1) Il est essentiel de préciser que cette loi s'établit dans des conditions bien définies : intensité lumineuse faible, concentration de soluté ($\simeq 10^{-4}$M/Litre), durée d'irradiation ne dépassant pas 30 s, rendement photochimique très faible. La cinétique d'un phénomène photochimique analogue, avec des intensités lumineuses élevées ou résultant de flash et un rendement important par exemple 50% serait différente.

2) Dans la première minute d'irradiation à 77°K, on enregistre une diminution importante (30%) de l'intensité de phosphorescence pour atteindre ensuite un régime stationnaire.

Nous n'avons pas fait d'étude systématique de ce phénomène. Il semble être en relation avec la formation de radicaux à partir des molécules de la cage du solvant qui crée donc un environnement paramagnétique. La formation continue des radicaux pouvant s'expliquer par un phénomène de migration des $\dot{H}$ le long des liaisons hydrogène .

Dans les mêmes conditions d'expérimentation, nous avons établi la loi de variation de $\frac{dR}{dt}$ en fonction de l'intensité lumineuse. Cette loi peut s'écrire : $\frac{dR}{dt} = K\, I^2$. (Fig. 48).

Dans un milieu rigide à 77°K avec une loi de décroissance du triplet qui est rigoureusement exponentielle, cette relation est en faveur de l'absorption consécutive de deux photons. Le fait que la formation des radicaux cesse instantanément lorsqu'on obture la source d'irradiation alors que la concentration en triplet décroit exponentiellement est une autre confirmation. Il est maintenant possible de proposer différents mécanismes de formation des radicaux :

α) absorption triplet-triplet. La population du niveau triplet T_1^* le plus bas est suffisante pour donner une absorption $T_1^* \longrightarrow T_k^*$ non négligeables. Des essais d'irradiation alternée avec deux radiations différentes : u. v. et visible, nous montrent que l'absorption triplet-triplet ne se ferait pas dans la première bande, c'est-à-dire selon $T_1^* \longrightarrow T_2^*$. L'énergie du deuxième photon doit être en effet du même ordre de grandeur que celle du premier pour avoir un effet de photosensibilisation. On peut donc avoir $T_1^* \longrightarrow T_3^*$ ou même : $T_1^* \longrightarrow T_4^*$: on a donc :

$$S_o \rightleftharpoons S_1^* \qquad S_1^* \rightleftharpoons T_1^* \qquad T_1^* \rightleftharpoons T_k^*$$

Au niveau T_K, il y aura transfert de l'énergie sur le solvant et photolyse de ce dernier.

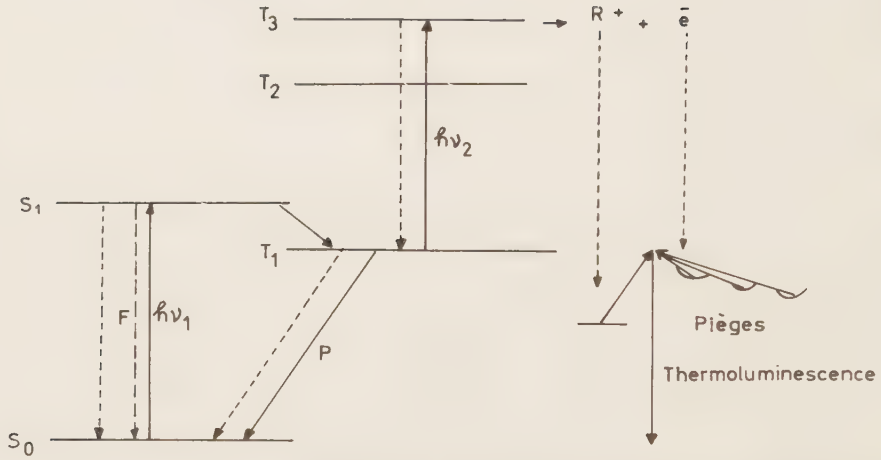
C'est en fait cette dernière étape qui pose des difficultés car il faudrait alors envisager la formation d'un complexe excité selon :

$$T_k^* + S_d \rightarrow (T_k \ldots S_d)^* \rightarrow (T_k^+ \ldots S_d^-)^* \longrightarrow (\dot{T}_k H \ldots \dot{R})^* \rightarrow S_o + \dot{H} + \dot{R}$$

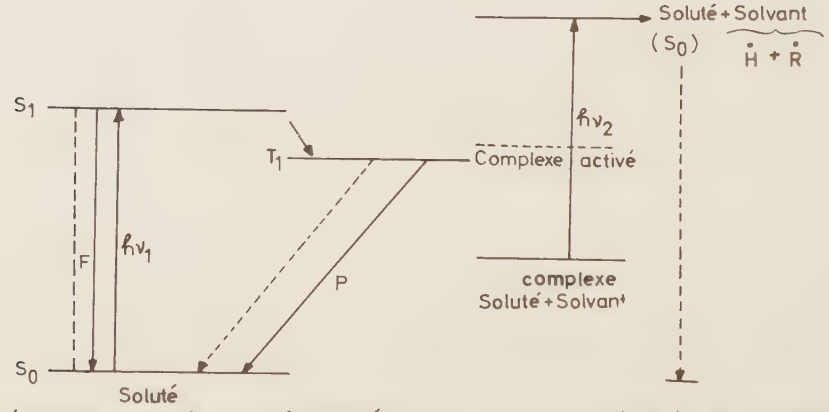
où : S_d est la molécule de solvant
$R = CH_3CH_2\dot{O}$

Par réaction secondaire, on a :

$$(CH_3CH_2\dot{O})_1 + (CH_3CH_2OH) \rightarrow (CH_3CH_2OH)_1 + (CH_3\dot{C}HOH)_2$$



Représentation simplifiée d'un phénomène de photo-éjection consécutif à une absorption triplet-triplet & phénomène de thermoluminescence consécutif à une recombinaison au niveau du premier triplet



Représentation simplifiée de la déshydrogénation du solvant consécutif à une double absor - -ption par le complexe intermediaire formé à partir du triplet du soluté.

Fig. 49

On conçoit mal en effet la formation d'un complexe seulement au niveau T_k^*. Alors que T_1^* est un niveau excité de même multiplicité. D'autre part la dissociation $T_k\dot{H} \rightarrow S_o + \dot{H}$ peut difficilement être envisagée. Par contre un complexe du type $(T_k^+ \text{----} S_d^-)$ s'accorderait assez bien avec les propriétés de photo-éjection du tryptophane et de la tyrosine inclus dans l'acide borique.

β)Formation d'un complexe intermédiaire

On peut envisager la formation d'un complexe avec l'état T_1^* de nature radicalaire

$$S_o + h\nu_1 \rightarrow S_1^* \rightarrow T_1^* + S_d \rightarrow (T_1 \ldots S_d)^* \rightarrow (\dot{T}_1H \ldots \dot{R})^*$$

Et l'absorption du second photon est faite par ce complexe :

$$(\dot{T}_1H \ldots \dot{R})^* + h\nu_2 \rightarrow S_o + \dot{H} + \dot{R}$$

De la même façon $(CH_3\ CH_2\ \dot{O})_1 + (CH_3\ CH_2\ OH)_2 \rightarrow (CH_3\ CH_2\ OH)_1 + (CH_3\ \dot{C}HOH)_2$.

Dans le travail (72) les auteurs attribuent un signal de résonance singulet qui apparait sous irradiation monochromatique à 316mμ, au complexe $(T_1\dot{H} \ldots \dot{R})$. Par irradiation à 365mμ, on a une diminution brutale de ce signal et une augmentation des radicaux du solvant. Le peu de connaissances que nous avons sur les propriétés de l'électron solvaté ne permettent guère pour le moment d'infirmer ou de confirmer une telle hypothèse.

Une étude plus complète par spectroscopie de flash menée en parallèle avec l'étude RPE nous permettra sans doute d'apporter quelques précisions sur ce problème.

3) Conclusion

Cette étude du phénomène de photosensibilisation de solvants alcooliques par des molécules d'intérêt biologique est, bien entendu, encore très préliminaire. En dehors des effets photodynamiques, ce phénomène n'a pas, à vrai dire, fait l'objet d'études approfondies en photobiologie; c'est pourquoi nous ferons ressortir les points suivants :

a) La R. P. E. est un moyen commode pour l'étude des cinétiques de formation des radicaux formés par photosensibilisation. Elle permet d'enregistrer des signaux distincts caractéristiques des radicaux et des triplets et d'établir éventuellement une corrélation des deux cinétiques.

b) A basse température, la photolyse intrinsèque des amino-acides en solution se montre très difficile à détecter. L'emploi d'un solvant alcoolique est un moyen détourné d'accéder à des réactions photochimiques provoquées par le soluté. Dans l'éthanol, la formation privilégiée du radical $CH_3\dot{C}HOH$ permet une étude quantitative de la photolyse. Cette réaction peut donc servir de test pour la caractérisation d'un phénomène de photosensibilisation. Les résultats obtenus sur les plastiques contenant les molécules phosphorescentes montrent bien la généralité d'un tel phénomène dans les verres organiques.

c) L'ensemble de nos résultats, ajoutés à ceux de TERENIN et DE SHIGORIN confirme bien l'importance fondamentale du triplet dans la photolyse

des alcools contenant des molécules phosphorescentes hétéroatomiques.

Par les mécanismes mis en jeu, on ne peut pas encore tirer de conclusions générales sur le rôle de cet état triplet sur la photochimie de l'amino acide placé dans d'autres conditions (cristal moléculaire ou protéine). Ce rôle semble néanmoins prépondérant par rapport à celui du singulet dont la propriété fondamentale est d'avoir à l'état excité un pK différent de celui de l'état fondamental.

d) Les études cinétiques nous ont conduit à faire l'hypothèse d'un mécanisme biphotonique, c'est-à-dire de l'absorption d'un deuxième photon à partir du triplet T_1 ou à partir d'un complexe (T_1 + solvant); le choix entre les deux possibilités ne peut être fait pour le moment. Dans les deux cas, les conséquences sont importantes. On opère en effet de cette façon une multiplication de l'énergie pour atteindre des états excités supérieurs, à partir desquels les réactions photochimiques sont probables. On ne peut manquer de faire un rapprochement avec les hypothèses faites pour les effets photodynamiques et aussi pour la radiolyse.

e) Le cas de la formation d'un complexe soluté-solvant attire le plus notre attention. Il signifie en effet que pour les molécules comportant des groupements C = O, N, etc ... susceptibles de former des liaisons hydrogène avec les solvants, l'excitation dans la bande d'absorption ultra-violette de soluté conduit à la formation de radicaux dans le solvant.

La réaction peut se faire par différentes étapes par exemple :

soluté $\xrightarrow{\bar{e}}$ solvant

soluté $\xleftarrow{H}$ solvant

etc.

Le bilan étant toujours : soluté + $\dot{H}$ + radicaux du solvant.

L'analogie avec des schémas pour la photolyse des polypeptides ou des protéines est frappante. Mais dans ces derniers cas, peu de faits expérimentaux concrets ont été apportés pour démontrer les échanges protoniques ou électroniques par l'intermédiaire des liaisons hydrogène .

La mise en évidence de la photosensibilisation par les acides aminés est un premier pas dans ce cas. Nous poursuivons activement l'étude du phénomène en utilisant des associations ou des combinaisons simples d'acides aminés aromatiques et aliphatiques.

III. 4. B. PHOTOLYSE DE LA TYROSINE ET DU TRYPTOPHANE DANS L'ACIDE BORIQUE

Nous ne ferons que résumer ici les principaux résultats obtenus au laboratoire par nos collaborateurs R. SANTUS et GUERMONPREZ.

1) en chauffant rapidement jusqu'à 250°C et sous azote un mélange acide borique + acide aminé, et il est possible de préparer des verres bien transparents. La phosphorescence et les propriétés photochimiques de ces verres nous conduisent à admettre qu'une grande partie de l'acide aminé incorporé est effectivement en solution.

L'irradiation à 77°K pendant des durées de 5 à 30 mn de ces verres conduit aux résultats suivants :

2) Absorption et émission. Il y a une modification très nette du spectre d'absorption : diminution du pic principal à 280mμ,
apparition de nouvelles bandes ayant des maxima à 320mμ et 420mμ pour la tyrosine,
pour le tryptophane (couleur bleue) à : 320mμ, 550 et 600mμ.

L'intensité de phosphorescence diminue de la même façon et peut même devenir négligeable.

Un réchauffement à la température ordinaire conduit à une restauration partielle de ce spectre. Un chauffage à 100°C achève cette restauration. En fait, à cette température, il est difficile d'éviter une oxydation partielle au moins pour le tryptophane. Il faudra donc limiter le nombre des cycles irradiation-réchauffement.

3) R.P.E. L'irradiation à 77°K provoque l'apparition de deux types de signaux :
- le signal caractéristique des atomes $\dot{H}$, stables jusqu'à 100°K,
- un signal plus large et mal résolu à g = 2,0 caractéristique des ions radicaux produits dans le soluté.

Au cours du réchauffement, ce signal se modifie en forme et en intensité traduisant une disparition partielle des radicaux, d'un réarrangement du milieu et de modification des temps de relaxation spin-réseau.
Un chauffage à 100°C fait disparaître le signal.

4) Phosphorescence de longue durée. Thermoluminescence. Si on cesse l'irradiation à 77°K, on enregistre d'abord la phosphorescence normale, puis une émission de même composition spectrale mais dont la durée est de plusieurs dizaines de minutes. La cinétique de cette émission est rigoureusement bimoléculaire. Par un lent réchauffement jusqu'à 300°K, on fait apparaître une thermoluminescence intense. La courbe d'émission I = f (T) (T = température absolue) n'est pas structurée et s'étend jusqu'au voisinage de la 300°K. Elle a la même composition spectrale que la phosphorescence. Un chauffage à 100° C produit une seconde émission moins intense de mêmes caractéristiques spectrales. Mais l'intensité de phosphorescence à 100°C d'un verre non irradié est déjà faible.

L'analogie avec les carbures aromatiques dispersés dans l'acide borique est frappante. D'autre part, en effectuant le transfert triplet triplet acétophénone→tryptophane, on obtient le même résultat qu'avec le tryptophane seul. On peut donc avancer les hypothèse suivantes :

a) C'est l'état triplet qui intervient dans le phénomène photochimique provoquer par l'irradiation u.v.

b) Il y a une photo-éjection d'électrons qui peut se faire suivant un processus à deux photons par absorption triplet-triplet :

$$S_o \rightarrow S_1^* \qquad S^* \rightarrow T_1^* \qquad T_1^* \rightarrow T_k^* \qquad T_k^* \rightarrow S_o^+ + \bar{e}$$

mais un processus faisant intervenir un complexe intermédiaire analogue à celui décrit précédemment est également possible.

c) Il y a plusieurs pièges possibles pour l'électron :

- les ions H^+ $\quad H^+ + \bar{e} \rightarrow \dot{H}$ stables
- des pièges peu profonds qui donnent déjà une recombinaison à 77°K et qui sont responsables du premier pic de thermoluminescence.
- des pièges plus profonds qui donnent la thermoluminescence à haute température.

5) Conclusion

a) Il existe une excellente corrélation entre les propriétés optiques et les propriétés magnétiques des acides aminés inclus dans des verres d'acide borique.

b) Le fait le plus remarquable est que la recombinaison conduit toujours à une émission à partir de l'état triplet.

c) Là aussi l'étude ne fait que commencer. Des données quantitatives telles que les cinétiques de recombinaison, les énergies d'activation nous permettront de différencier mieux les mécanismes possibles et de préciser :

- le rôle de l'eau résiduelle
- le mécanisme de formation des atomes H (déprotonation, déshydrogénation, rupture de liaison sur la molécule de soluté, ...)
- l'importance de la photo-éjection
- la nature des pièges.

L'ensemble de ces faits constituera un complément précieux aux propriétés déjà trouvées dans le cas des solutions organiques. Il aidera également à mieux comprendre les résultats obtenus pour l'irradiation en phase solide que nous allons exposer maintenant.

III. 4. C. PHOTOLYSE DES ACIDES AMINES ET DES PROTEINES A L'ETAT DE POUDRES MICROCRISTALLINES

Les résultats précédents montrent clairement les difficultés rencontrées dans l'étude de la photolyse propre des acides aminés ; au moins lorsqu'on se place en solution organique. C'est pourquoi nous avons tenu à la compléter par l'étude de la photolyse en phase solide. Nous pourrons faire des rapprochements avec les résultats obtenus :

a) sur la thermoluminescence des poudres en particulier par GILL et WEISS-BLUTH (76)

b) sur la photolyse des protéines (ALLEN et INGRAM) (62)

c) sur la radiolyse des acides aminés en particulier par KOCH et ses collaborateurs (77).

1 - Photochimie du cristal moléculaire et des poudres microcristallines.

L'étude des radicaux produits au sein des cristaux moléculaires a été essentiellement étudiée par l'action des radiations dures : rayons X et γ. On obtient de cette façon des concentrations suffisantes d'espèces paramagnétiques

et l'anisotropie cristalline permet une détermination précise de leur nature et de leur structure. L'action des radiations ultra-violettes présente des caractères différents :

1) La pénétration au sein du cristal est faible étant donné le coefficient d'absorption très élevé par unité de masse (de l'ordre de 0,5 μ pour le tryptophane à 13 μ pour la phénylalanine).

Dans le cas d'un cristal protéique la pénétration sera de 20 à 30 fois supérieure (Trypsine). Mais de toute façon à l'échellon macroscopique, la photochimie sera essentiellement un phénomène de surface.

2) Du point de vue énergétique, cette photochimie sera sélective comme dans les cas des solutions et elle pourra se faire avec un excellent rendement étant donné le coefficient d'absorption élevé.

A - Dans un cristal, lorsque les énergies d'interaction sont du même ordre de grandeur que les énergies de liaisons chimiques, les molécules perdent leur individualité : c'est le cas des cristaux ioniques, de valence ou métallique. Dans un cristal moléculaire, les forces de liaison sont au contraire des forces secondaires telles que liaisons hydrogène, forces de Van der Waals. Les molécules gardent une plus grande partie de leur individualité.

La description des propriétés optiques du cristal partira donc des propriétés optiques de la molécule isolée pour lesquelles on déterminera l'influence des interactions moléculaires comme terme de perturbation. Cette description aboutit au concept de l'exciton moléculaire selon le modèle de DAVYDOV (78) basé sur les propriétés de migration de l'énergie au sein du cristal.

Nous ne pouvons faire ici une description complète des propriétés qui en résultent en ce qui concerne : l'absorption, le transfert, l'émission, la conversion vibrationnelle ou photochimique de l'énergie. Deux faits sont essentiels :

a) l'aptitude du cristal à résorber l'énergie d'excitation sous forme vibrationnelle c'est-à-dire à donner une désactivation non radiative.

b) la possibilité d'atteindre des niveaux d'excitation plus élevés par annihilation de deux états excités triplets.

$$T_1^* + T_1^* \rightarrow T_i^* \text{ ou } S_2^*$$

Les propriétés essentielles du cristal seront données

a) par les défauts de réseaux

b) par les impuretés

Un contrôle rigoureux de ces deux facteurs est difficilement possible étant donné les difficultés de préparation et de contrôle des cristaux moléculaires. L'application systématique des techniques de fusion de zone en représente certainement une étape importante.

Les espèces photochimiques produites ne diffèrent pas, à priori, de celles obtenues pour les molécules isolées. C'est le mode de stabilisation de ces espèces qui pourra différer. Rappelons que l'on pourra obtenir :

a) des formes isomères dans les limites compatibles avec la structure locale du réseau.

b) des radicaux formés par photo-éjection ou perte d'ion H^+.

c) des radicaux formés par rupture des liaisons chimiques C-C, C-N, etc.

d) des complexes à transfert de charge .

La stabilisation de ces espèces dépend :

- de la température qui stabilise des configurations instables
- des défauts de réseaux (- des impuretés) qui agissent comme "pièges"

B - Les difficultés de préparation des cristaux moléculaires conduisent souvent, à utiliser en pratique, des poudres micro-cristallines. Les dimensions et la structure des grains varient considérablement d'une espèce à l'autre : on peut aller de véritables monocristaux de quelques $\frac{1}{10}$ mm à des grains polymorphes de $\frac{1}{50}$ à $\frac{1}{100}$ mm.

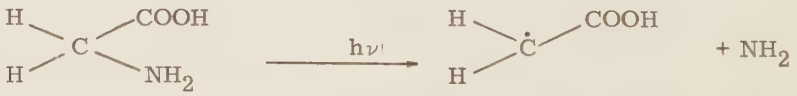
Le fait essentiel reste l'augmentation considérable du rapport $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ c'est-à-dire l'importance primordiale des phénomènes purement superficiels dus aux dislocations et aux défauts de réseaux, à l'absorption d'impuretés (oxygène), ou à la complexation avec des ions de métaux lourds.

En R. P. E. le signal de la poudre sera en général peu résolu puisqu'il représente la superposition des signaux des radicaux piégés dans des sites anisotropes dont le facteur g varie autour de 2.

2 - Etude de quelques acides aminés

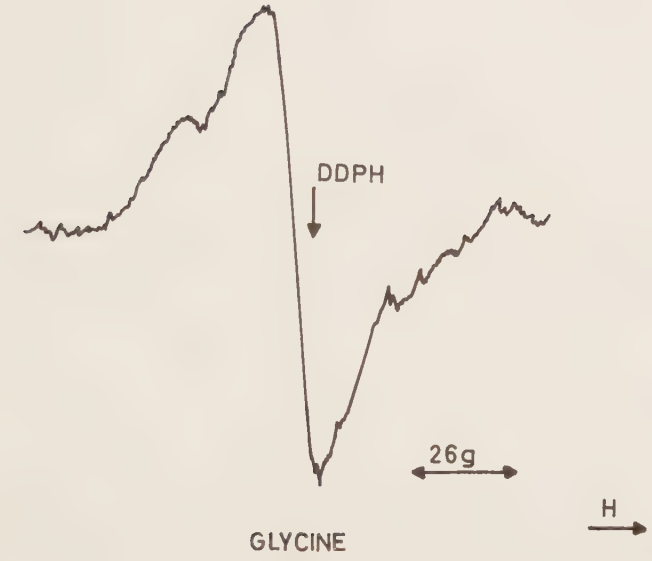
a) Glycine. Glycylglycine. Bien que l'absorption de ces deux composés soit excessivement faible dans le domaine d'émission de la source utilisée (HBO 200) il est possible de produire par une irradiation de 10 minutes à 77°K une quantité de radicaux suffisante pour l'étude par RPE. Avec la glycine on obtient (Figure 50) un signal laissant apparaître une structure à trois raies vers g = 2,0

Nous attribuons la formation de ces radicaux à l'action de l'émission résiduelle à 253,7 mμ qui conduit à la réaction classique de déamination des acides aminés.



Dans le cas de la glycylglycine, le signal obtenu ne présente pas une résolution suffisante pour pouvoir justifier une réaction analogue à la présente. Rappelons qu'à 253,7 mμ nous avons admis un coefficient $\varepsilon \simeq 1$ pour la liaison -CONH-

La production de radicaux par rupture de cette liaison peut donc devenir compétitive avec la réaction de déamination. La résolution de ce problème impose de travailler sur un monocristal, par analogie avec les résultats obtenus par GORDY avec les rayons X (79).



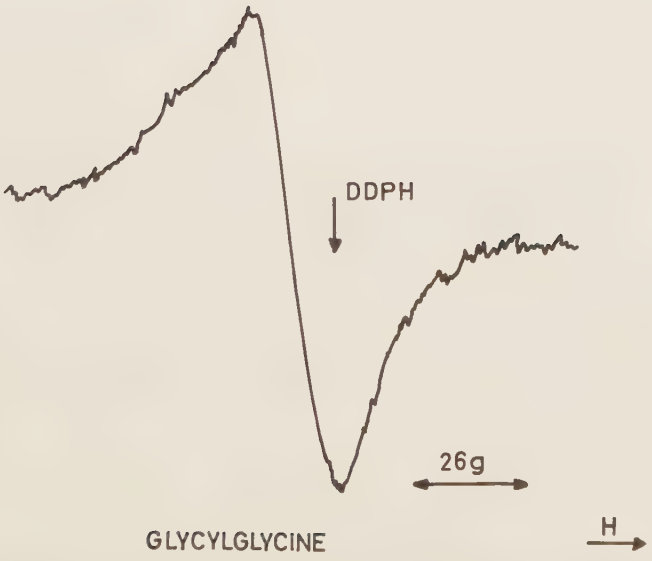


Fig. 50 Résonance des radicaux produits par l'irradiation ultra-violette à 77°K de poudres microcristallines

Comme pour tous les autres acides aminés, nous utilisons des échantillons parfaitement dégazés sous vide (10^{-5} mm de Hg). En fait, l'oxygène ne semble pas avoir un rôle primordial dans la photolyse, contrairement aux traces d'eau résiduelle qui font disparaître totalement le signal par réchauffement à la température ordinaire conduit à une diminution de 50 à 80 % de l'intensité du signal. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de J. E. GILL (80) qui trouve pour la glycine un signal légèrement structuré à 3 raies

Très récemment R. B. JOHNS et D. J. WHELAN ont publié des résultats très voisins (photolyse pendant 48 h à 253,7 mμ avec une lampe de 500 watts). Sur la glycine les résultats sont complexes mais avec L. Alanine et D. L. Valine ils obtiennent des spectres caractéristiques des réactions de déamination. Par exemple un spectre à 5 raies caractéristiques du radical (81) :

$$CH_3 - \dot{C}H - CO_2H$$

qui est identique à celui obtenu par γ -irradiation.

Conclusion

Une telle photolyse des acides aminés aliphatiques non soufrés est à priori inattendue. Elle montre la nécessité de tenir compte des émissions résiduelles très faibles voisines de 253,7 mμ de nos sources au mercure.

Il est très difficile d'apprécier le rôle des impuretés dans un tel phénomène. Ces impuretés sont de deux sortes :

- ions des métaux de transition (Cu et Fe)
- composés organiques phosphorescents.

Elles peuvent se trouver en proportion difficilement décelable par RPE ou la spectrophosphorimétrie mais suffisante pour intervenir dans le phénomène de photolyse.

Remarque

Les phénomènes de photosensibilisation des solvants aliphatiques par le tryptophane nous ont conduit à entreprendre une étude analogue sur des mélanges d'acides aminés tels que : glycine-tryptophane pour voir si des mécanismes analogues peuvent être invoqués. Les très récents travaux d'AZEZOVA (82) sur des mélanges dans la glace à 77°K confirment au moins en partie cette hypothèse.

b) Acides aminés soufrés. Nous avons vu que l'absorption de ces composés dans la zone des courtes longueurs d'onde n'est plus cette fois négligeable et d'ailleurs les résultats sont plus nets.

Cystine

Rappelons la formule :

$$\begin{matrix} COOH \\ NH_2 \end{matrix} \!\!> CH - CH_2 - S - S - CH_2 - CH <\!\!\! \begin{matrix} COOH \\ NH_2 \end{matrix}$$

Par irradiation à 77°K on fait apparaître un signal asymétrique dont la structure est mal résolue (Figure 51). Par réchauffement à la température ordinaire,

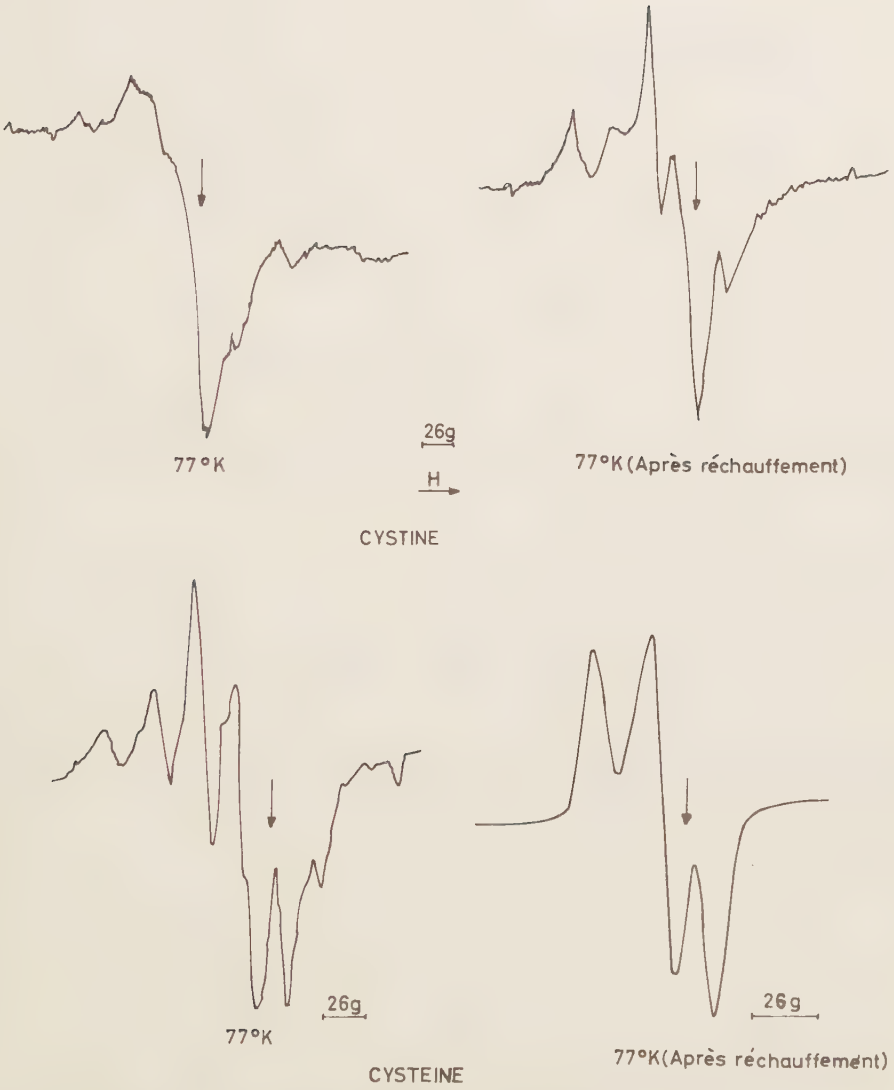


Fig. 51 Résonance des radicaux produits par l'irradiation ultra-violette à 77°K de poudres microcristallines

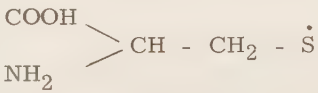
le signal se stabilise et se résoud en une structure avec 4 raies principales.

Il est fort probable que l'état physique du composé intervient car on ne rattache pas facilement ces signaux, par ailleurs faibles, aux radicaux possibles :

- un ion radical formé par photo-éjection d'un électron célibataire à partir d'un soufre (à 77°K).

qui devrait conduire à une structure caractéristique à 5 raies par interaction avec 4 protons.

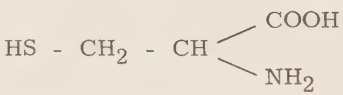
- le radical formé par rupture de la liaison - S - S -



plus stable à la température ordinaire et obtenu par ailleurs couramment par irradiation X et γ.

Cystéine

Rappelons la formule :

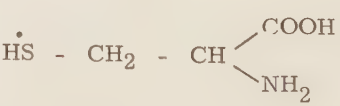


Les signaux sont beaucoup plus intenses dans ce cas. A 77°K on obtient un signal à 5 raies principales (la 6ème doit être attribuée à une impureté) qu'on peut interpréter de deux façons :

- formation d'un radical

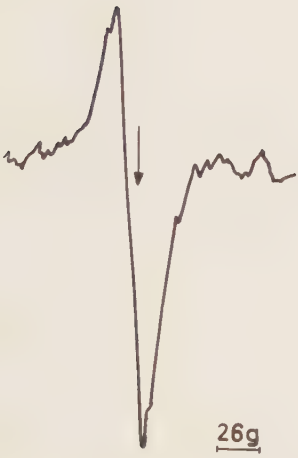
par départ des atomes H et dimérisation

- formation d'un radical



par photo-éjection à partir d'un soufre

Le signal se stabilise par réchauffement et donne une structure extrémement nette à 3 raies, qu'on peut attribuer au radical.



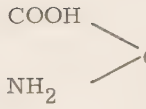
HISTIDINE
77°K

PHENYLALANINE
77°K

TYROSINE
77°K

TRYPTOPHANE
77°K

Fig. 52 Résonance des radicaux produits par l'irradiation ultraviolette à 77°K de poudres microcristallines

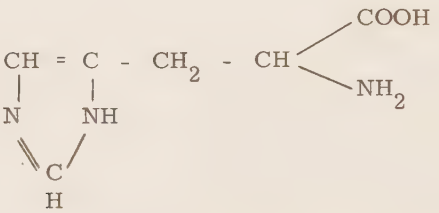


formé par rupture du dimère précédent.

AZEZOVA propose un mécanisme différent en attribuant ce signal à un radical de la forme R- (S---S)$^{+}$R. obtenu par dimérisation des ions positifs obtenus à 77°K. Il faut alors envisager une transition de l'électron célibataire sur l'un des atomes de S ou même sur un carbone α pour obtenir l'interaction avec 2 protons équivalents. Il semble que le premier mécanisme soit plus plausible et conforme aux résultats obtenus en radiochimie.

c) Acides aminés hétérocycliques et aromatiques

Nous avons choisi l'histidine de formule



Le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine. Avec ces quatre acides aminés on obtient des signaux non structurés dont l'intensité diminue par réchauffement. Il n'est pas possible de relier ces signaux à des radicaux particuliers. On remarque simplement que le signal de la tyrosine qui comporte un groupement OH est beaucoup plus intense que celui de la phénylalanine dont le spectre d'absorption culmine cependant vers 260 mμ.

Dans la zone 280-310 mμ, il est fort probable que la déamination n'est plus le phénomène essentiel. On peut envisager l'intervention de mécanismes différents en particulier :

1) la photo-éjection d'un électron. L'énergie nécessaire étant atteinte par un mécanisme d'absorption biphotonique :

- absorption triplet-triplet

- annhilition de deux triplets.

Ce dernier mécanisme est beaucoup plus probable au sein du cristal moléculaire. Rappelons qu'il est invoqué pour la génération des porteurs de charge par irradiation dans les cristaux organiques tels que l'anthracène ou le naphtalène.

L'électron n'a que le choix des pièges : impuretés métalliques, défauts de réseau, O_2 résiduel, piège moléculaire ($A + \bar{e} \rightarrow \bar{A}$).

2) la perte d'un H. Soit directement à partir d'un NH pour l'histidine et le tryptophane, soit d'une façon plus certaine par des mécanismes voisins de ceux que nous avons proposé dans le cas des solutions et faisant intervenir des liaisons hydrogène .

Fig. 53 **Radicaux produits par irradiation ultra-violette de poudres microcristallines**

d) Peptides. Sur la figure 53 sont reportés les signaux obtenus à partir du glutathion et de la tryptophylphénylalanine.

Pour le dipeptide, le signal est dissymétrique et sans structure et ne peut être attribué à un radical particulier.

Dans le cas du glutathion qui est un tripeptide d'acide glutamique, de glycine et de cysteine. Le signal à basse température comporte un singulet étroit qui se superpose à un signal plus structuré provenant de la cysteine. Par réchauffement, le signal se résoud et se rapproche de celui de la cystéine obtenu dans les mêmes conditions. Une structure supplémentaire provient de l'inhomogénéité de notre échantillon quant à la grosseur des grains.

3) Cas des protéines

Sur la figure 54 sont reportés les signaux obtenus par irradiation de la tyrosine et de l'albumine d'oeuf. Ces signaux ne se rattachent pas facilement aux signaux des acides aminés constitutifs. Pour l'albumine la forme du signal se modifie en fonction de la température.

- à 77°K il est formé d'un singulet étroit superposé à un signal plus complexe qui donne deux raies satellites
- à 300°K le signal s'élargit et se transforme en un doublet relativement symétrique
- par recongélation, on fait réapparaître un signal singulet.

Dans le cas de la trypsine, il n'y a pas de modification de la structure du signal.

Il semble bien que l'on puisse attribuer le signal complexe sous-jacent qui se modifie en fonction de la température aux restes soufrés de la protéine. La nature du signal singulet n'est pas élucidée. Il est certainement relié au contenu de la molécule en acides aminés aromatiques qui représentent les centres captant la presque totalité de l'énergie absorbée par la protéine.

Nous ne connaissons pas pour le moment les propriétés photochimiques des acides aminés aromatiques combinés en particulier en ce qui concerne la photo-éjection. Nous avons vu que les propriétés de phosphorescence des résidus aminés dépendent de la structure de la macromolécule mais qu'elles ne sont essentiellement différentes de celles obtenues pour les molécules d'acides aminés en solution.

Nous pouvons donc maintenir notre hypothèse de la photo-éjection à partir des groupements du tryptophane et de la tyrosine. Un certain nombre de faits expérimentaux viennent à l'appui de cette hypothèse.

a) La photo-éjection des acides aminés dans les milieux rigides, qui donne lieu à une phosphorescence de longue durée dont la cinétique est bimoléculaire. Cette propriété s'accorde parfaitement avec les résultats de P. DEBYE et J. O. EDWARDS (83) qui ont étudié en particulier la phosphorescence de longue durée du tyrosinate de sodium et de la sérum-albumine bovine dans NaOH à 77°K.

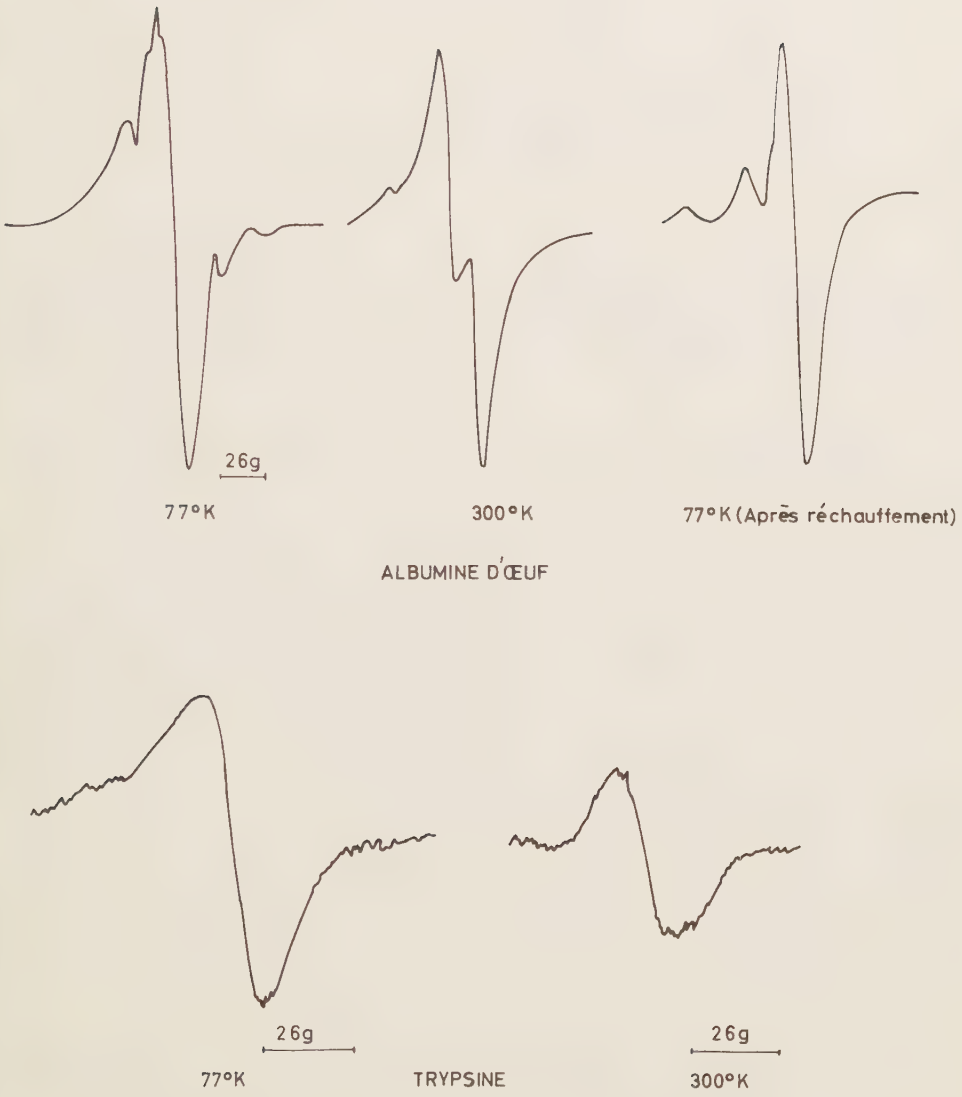


Fig. 54 Résonance des radicaux produits par l'irradiation ultra-violette à 77°K de poudres microcristallines

La loi de décroissance de l'émission s'écrit :

$$I = \frac{k}{t^n} \qquad n \simeq 1,0 \qquad k \text{ étant un facteur instrumental}$$

A partir de cette loi et d'une loi de diffusion du type : $D = \frac{jl^2}{\sigma}$

où : D est la constante de diffusion,

j : le nombre de collisions par seconde

l : la longueur moyenne du trajet entre les collisions,

ces auteurs ont pu calculer une fonction de distribution des électrons dans le milieu rigide.

A l'état solide les protéines donnent une émission de longue durée qui est une phosphorescence des acides aminés aromatiques très analogue à la précédente et que nous proposons d'interpréter par le même processus. La partie haliphatique qui constitue en fait la presque totalité du milieu protéique constitue en fait un excellent support pour la diffusion des électrons.

Les pièges étant constitués par :

- les impuretés,
- les bouts de chaine
- les groupements sulfurés ou aromatiques.

b) La thermoluminescence. Nous avons mentionné précédemment les premiers résultats obtenus sur l'émission des acides aminés dispersés dans l'acide borique, résultats qui sont très en faveur d'un mécanisme de photo-éjection. En ce qui concerne les poudres d'acides aminés et de protéines nous n'avons pas obtenu de résultats différents de ceux de GILL et WEISS BLUTH (76). Ces auteurs ont montré que l'émission était pratiquement identique à la phosphorescence. C'est-à-dire que la recombinaison conduit au niveau triplet des molécules d'acides aminés aromatiques. La difficulté est de relier l'émission entre 77°K et 300°K qui correspond à environ 10^{10} photons à la variation du signal RPE $\simeq$ (10^{14} spins). On peut remarquer :

1) que la probabilité d'émission par recombinaison de thermoluminescence peut être très faible. Il suffit de comparer aux rendements évalués à 10^{-4} pour la thermoluminescence des cristaux ioniques.

2) qu'il existe un quenching de phosphorescence du aux espèces paramagnétiques formées.

3) que cette émission peut ne représenter, comme dans le cas des solutions, qu'une faible partie des réactions de restauration qui ont lieu en fait à plus haute température. Une expérimentation dans ce cas est en cours.

4) que la modification des temps de relaxation, les réactions d'échange et les réarrangements du milieu en fonction de température, rendent l'étude cinétique par RPE particulièrement délicate.

Il n'y a donc pas d'incompatibilité entre ces résultats et l'hypothèse initiale de la photo-éjection d'électron.

4 - Conclusion

a) Inspirée par les résultats obtenus en solution, l'étude en phase solide nous a permis de confirmer le rôle essentiel joué par les acides aminés aromatiques dans la photochimie des protéines ainsi que par les restes soufrés dans le domaine des plus courtes longueurs d'ondes et de proposer un mécanisme original faisant intervenir une double absorption.

b) Elle montre l'orientation nécessaire des études vers la photochimie du monocristal irradié en lumière monochromatique. Elle met en relief l'importance des résultats de thermoluminescence qui permettront de préciser plus facilement la nature des photo-produits et leur mode de recombinaison en fonction du milieu.

c) Elle suggère une comparaison intéressante avec les résultats obtenus par les irradiations X et γ. Il semble que l'on obtienne des espèces très voisines et une étude de la photo-résistance des protéines en fonction de leur composition en acides aminés analogue de J. DUCHESNE (84) et ses collaborateurs pour la radio-résistance doit être faite.

d) Enfin elle montre toutes les difficultés suscitées par l'interprétation de ALLEN et INGRAM (62) sur l'existence de propriétés spécifiquement supramoléculaires pour les protéines, interprétation essentiellement basée sur des résultats de RPE. S'il est vrai que l'existence de la semi-conductivité ne doit pas être à priori refutée, il semble préférable d'y aboutir au terme d'une progression très systématique partant des acides aminés isolés et parfaitement définis, en passant aux combinaisons peptidiques bien choisies et comportant un nombre d'unités croissant, pour arriver à des protéines parfaitement définies chimiquement comportant des pourcentages d'eau libre ou liée bien connus et dont la structure primaire ou secondaire sera à chaque instant déterminée.

*

CHAPITRE IV

CONCLUSION
PERSPECTIVES

En partant des données classiques de la littérature sur les acides aminés aromatiques, nous avons mené une étude expérimentale avec deux techniques principales : l'optique d'émission et la RPE, selon le cycle représenté dans la figure 1.

Cette étude a permis d'apporter, au cours de chaque étape, un certain nombre de résultats originaux sur la structure électronique et les propriétés photochimiques de ces composés. Elle a également permis d'ouvrir des voies de recherche nouvelles qui s'avèrent dès maintenant très fructueuses.

IV. 1- CONCLUSIONS

A/ METHODES EXPERIMENTALES

1) Nous avons mis au point et utilisé de façon systématique une méthode d'étude de l'état triplet des acides aminés aromatiques, en associant la phosphorimétrie en solution rigide et la RPE. Un montage qui permet l'enregistrement simultané des déclins optiques et magnétiques a été réalisé. L'irradiation monochromatique et l'analyse spectrale de la lumière émise pourront facilement être faites dans la prochaine étape.

2) Le travail aux basses températures nous a conduit à faire un choix de solvants donnant des verres transparents. Nous citerons :

a) Les solvants organiques tels que les alcools méthylique et éthylique , les alcools supérieurs, les mélanges d'alcool et d'éther, l'E. P. A. , le propylène glycol, etc ... L'utilisation de ces solvants est classique mais nous avons mis en évidence un phénomène de photosensibilisation faisant intervenir l'état triplet du soluté et conduisant à une photolyse importante du solvant. Ce phénomène permet de définir avec précision les conditions d'emploi de tels solvants; conditions qui sont souvent négligées en spectroscopie et en photochimie.

b) Les plastiques qui ont l'avantage d'être rigides à la température ordinaire. Le travail préparatoire que nous avons fait sur des carbures aromatiques dispersés dans le polyméthylmétacrylate a montré :

α) la possibilité d'étudier la phosphorescence et la résonance de l'état triplet en fonction de la température. L'intensité de la phosphorescence et sa durée de vie dépendent essentiellement de la viscosité du milieu. Le facteur D de la résonance et la largeur de raie dépendent également du milieu. Nous n'avons pas trouvé de variation de ces facteurs en fonction de la température.

β) l'utilité de disposer d'échantillons solides et calibrés pour enregistrer en RPE des transitions $\Delta m = 2$ en champ parallèle. La cavité spéciale qui a été réalisée à cet effet nous a permis de retrouver les spectres classiques des carbures et de détecter ceux de l'indole et du tryptophane.

γ) l'importance de l'effet oxygène. La diffusion de O_2 dans le plastique dès la température ordinaire conduit à une extinction quasi-totale de la phosphorescence. Cet effet peut en partie s'interpréter par une dégradation oxydante conduisant à une diminution de la viscosité locale. La restauration de la luminescence peut être faite par diffusion de l'hydrogène dans le plastique.

L'ensemble de ces résultats s'applique au cas des acides aminés.

c) Les cristaux mixtes. Nous avons réussi pour la première fois à inclure des acides aminés (tryptophane, tyrosine) dans un cristal minéral (acétate de cadmium).

L'étude optique montre que le tryptophane a une orientation strictement préférentielle suivant les plans (100) du système monoclinique prismatique. La tyrosine au contraire est répartie de façon homogène. Les concentrations obtenues sont, pour le moment, insuffisantes pour permettre de détecter la résonance de l'état triplet du soluté.

La préparation de ces monocristaux mixtes d'un type nouveau a été faite en même temps que celle, plus classique, de cristaux mixtes organiques. Les importants résultats obtenus avec ces derniers n'entrent pas dans le cadre de ce travail et seront publiés par ailleurs.

d) L'acide borique et les silicates qui donnent des verres rigides dans un très large intervalle de température. Ce sont d'excellents pièges pour les atomes H à 77°K. Avec les verres d'acide borique, nous avons montré l'existence d'une thermoluminescence en deux étapes, différente de celle obtenue après l'irradiation des acides aminés polycristallins. Le phénomène photochimique principal que nous supposons être la photo-éjection dépend essentiellement de la présence d'ions H^+ et d'eau résiduelle dans le milieu.

B/ LUMINESCENCE. TRANSFERT DE L'ENERGIE

1) Fluorescence. Par l'étude en fonction du P_H des solutions aqueuses d'acides aminés aromatiques et de différents peptides, nous avons démontré l'existence d'interactions entre le cycle aromatique excité à l'état singulet d'une part, les groupements terminaux (COOH, NH_2), la liaison peptidique (-CONH-) et l'environnement d'autre part. L'extinction de la fluorescence ne permet pas de démontrer quantitativement un transfert de l'énergie entre les trois acides aminés.

2) Phosphorescence. L'enregistrement de cette émission a été fait pour des échantillons polycristallins, pour des solutions très diverses et dans de larges intervalles de température. L'existence du transfert d'énergie n'a pas

non plus été démontré quantitativement. Les résultats obtenus ont servi en fait de base pour l'étude RPE.

3) Transfert de l'énergie. La position respective des niveaux d'énergie singulet et triplet des trois acides aminés étudiés, la détermination très difficile de tous les effets d'extinction de la luminescence ont rendu impossible la démonstration univoque d'un phénomène de transfert. Le fait le plus probable est le transfert TRIPLET→TRIPLET dans le sens

PHENYLALANINE → TYROSINE
↘ ↓
TRYPTOPHANE

Ce transfert peut être incomplet comme le montre l'émission particulière de la tyrosine dans l'albumine bovine.

C/ RESONANCE PARAMAGNETIQUE DE L'ETAT TRIPLET

Les travaux publiés dans ce domaine jusqu'en 1962 portaient uniquement sur des carbures aromatiques. Les résultats que nous avons obtenus dans ce domaine constituent donc le début d'une application systématique de la méthode à l'étude des molécules d'intérêt biologique. Une étude comparative avec les carbures dont dérivent directement les amino-acides, permet de montrer l'influence des groupements latéraux sur l'état triplet de cycle aromatique. Les groupements NH_2 et COOH d'une chaîne latérale ne modifient pratiquement pas la position et la forme de la raie de résonance. Par contre, l'ionisation du groupement OH directement rattaché à un cycle benzénique influe de façon importante sur les facteurs du "splitting" en champ nul. En plus de ces études structurales, nous avons utilisé la résonance du triplet pour établir des cinétiques de dégradations photochimiques. Cette méthode, peu utilisée jusqu'à maintenant, se montrera certainement des plus utiles dans l'étude des phénomènes photochimiques faisant intervenir des triplets de durée de vie suffisante. Elle nous a permis de proposer les mécanismes décrits ci-après.

D/ PHOTOCHIMIE

1) L'étude de la photochimie à basse température des solutions organiques d'amino-acides n'a pas permis d'identifier des radicaux provenant du soluté. Elle a montré par contre l'existence d'une photo-sensibilisation importante du solvant, faisant intervenir l'état triplet du soluté. Les cinétiques de formation des radicaux dans l'éthanol nous ont conduit à proposer un mécanisme biphotonique.

$$S_o \xrightarrow{h\nu 1} S_i^* \longrightarrow T_1^* \qquad T_1^* \xrightarrow{h\nu 2} T_2^* \qquad T_2^* + \text{solvant} \longrightarrow \text{radicaux}$$

ou encore

$$S_o \xrightarrow{h\nu 1} S_i^* \longrightarrow T_1^* \qquad T_i^* + \text{solvant} \rightarrow \text{complexe} \qquad \text{complexe} \xrightarrow{h\nu 2} \text{radicaux}$$

Un tel mécanisme, très voisin de celui de l'annihilation de deux triplets, pourra contribuer à définir les propriétés photodynamiques du triplet. Si elle est confirmée, la formation d'un complexe avec le solvant, par analogie avec le cas des cétones et des amines aromatiques étudié par SHIGORIN et ses coll., constituera un fait d'expérience fondamental.

L'intervention des atomes à doublets libres tels que N et O et des liaisons hydrogène est en effet à la base des théories actuelles de la photolyse des molécules biologiques.

Rappelons pour terminer, que par l'étude des verres d'acide borique contenant des acides aminés, nous avons trouvé un phénomène nouveau de thermoluminescence. La recombinaison en deux étapes des photoproduits obtenus avec ces préparations est en faveur d'un phénomène de photo-éjection d'électrons. La constitution particulière du milieu ne permettant pas l'observation de l'électron solvaté au sens classique du terme.

2) Dans le cas des échantillons polycristallins, nous avons montré la possibilité d'obtenir des radicaux par irradiation ultra-violette pour les acides aminés aromatiques seuls. La nature de ces radicaux n'a pas été élucidée. Le fait qu'il s'en forme pour certains acides aminés aliphatiques attire l'attention sur un rôle éventuel "d'impuretés" difficiles à déceler par les méthodes habituelles de contrôle. L'analogie des signaux de RPE obtenus avec des albumines et des acides aminés soufrés démontre le rôle essentiel des liaisons -S-S- dans la photolyse des protéines.

L'ensemble de ces résultats, par sa complexité et par les discussions qu'il suggère, montre que, pour le moment, il est encore difficile sinon impossible, d'interpréter les propriétés électroniques des protéines par des mécanismes physiques tels que celui de "semi-conductivité".

IV. 2- PERSPECTIVES

Des prolongements intéressants, dont certains sont déjà en cours, résultent de notre travail essentiellement exploratoire. Nous pouvons les résumer brièvement comme suit :

1) En ce qui concerne l'étude de la résonance de l'état triplet, les points suivants sont à développer :
- utilisation des très basses températures (20°K et 4°K),
- utilisation de nouvelles cavités de type hélicoïdal à ondes progressives,
- utilisation de fréquences plus élevées (35GC) pour les cristaux,
- utilisation d'analyseurs multicanaux à mémoire permettant d'améliorer le rapport signal/bruit et d'enregistrer les cinétiques rapides.

2) Une partie importante sera consacrée à l'utilisation des verres rigides à la température ordinaire et à celle des cristaux mixtes. Ces milieux originaux nous permettant d'étudier en particulier :
- l'influence de l'oxygène sur la luminescence,
- la photochimie en phase vitreuse et surtout en phase cristalline,
- la thermoluminescence de composés en solution.

3) Un choix judicieux des combinaisons d'acides aminés (di, tri et tétrapeptides, oligopeptides, polypeptides) permettra de préciser définitivement la validité des tests optiques (absorption et émission) pour l'étude des interactions et plus généralement des propriétés supra-moléculaires dans les protéines. La détermination quantitative d'un transfert de l'énergie nécessite de préciser :
- la position relative (distance, orientation) des différents moments de transitions des molécules impliquées dans le transfert,
- l'influence du milieu sur les conversions entre les états excités (intersystem crossing) et sur la désactivation non radiative,
- le taux de délocalisation des électrons dans le squelette peptidique ne comportant pas à priori de conjugaison.

4) L'étude de la RPE des états triplets peut contribuer très efficacement à résoudre les problèmes précédents.

a) l'étude des cristaux mixtes permet en effet :
- de préciser l'orientation du tenseur de couplage du triplet par rapport aux axes moléculaires,
- d'obtenir la structure hyperfine de l'état excité conduisant aux densités de spins.

b) l'étude de solutions de certains carbures et de molécules hétérocycliques vient de nous permettre de mettre au point une méthode d'étude en lumière polarisée des molécules résonant pour des valeurs stationnaires du champ (magnéto-sélection), méthode qui permet de déterminer la direction du moment de transition $So \rightarrow S_1$.

c) en se limitant à l'étude de la position et de la forme des raies $\Delta m = 2$, on peut être renseigné sur l'influence de l'environnement et des associations ou combinaisons (effets de l'ionisation, des groupements latéraux, effet de solvant, formation d'agrégat, effet de la polymérisation).

5) Enfin, dans le domaine de la photochimie les trois points suivants offrent le plus de possibilités :
- étude des mécanismes à plusieurs photons dans les solutions et dans certains cristaux moléculaires; étude dans laquelle il faudra procéder à des irradiations monochromatiques continues, alternées ou intermittentes.
- étude de la photo-éjection d'électrons dans les systèmes macromoléculaires,
- étude de l'influence des liaisons hydrogène sur les échanges de protons et d'électrons intermoléculaires.

C'est certainement dans ce domaine particulièrement riche qu'il sera possible de faire apparaître de véritables propriétés électroniques supra-moléculaires ayant plus directement un intérêt du point de vue biologique.

Notre contribution se situe donc tout à fait au début d'une recherche très progressive qui va du monomère au polymère et qui nous rapprochera d'une meilleure compréhension des propriétés électroniques fondamentales des biomolécules.

*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. P. DEBYE et J. O. EDWARDS - Science 116, 143 (1952).
2. R. H. STEELE et A. SZENT-GYÖRGYI - Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 540 (1958).
3. G. WEBER - Biochem. J. 75, 335 (1960).
4. Iu. A. VLAMIDIROV et F. F. LITVIN - Biofizika 5, 127 (1960).
5. W. GORDY et H. SCHIELDS - Proc. Nat. Acad. Sci. 41, 983 (1955).
6. C. REID "Excited States in Chemistry and Biology". Butterworths. Sc. Pub. 1957.
7. Voir : H. H. JAFFE et M. ORCHIN "Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy. J. WILEY and Sons, Inc. 1962.
8. Voir : NOYES, HAMMOND, PITTS - "Advances in Photochemistry". Interscience 1963.
9. M. FÖERSTER - Ann. der Physik. 2, 55 (1948).
10. M. KASHA - Rad. Res. 20, 55 (1963).
11. G. H. BEAVEN et HOLIDAY - "Advances in Protein Chemistry". Vol. 7 Acad. Press. 1952.
12. DEDEKEN et Coll. - B. B-A 19, 45 (1956).
13. E. KATCHALSKI et Coll. - J. Am. Chem. Soc. 75, 5284 (1953).
14. B. PULLMAN et A. PULLMAN - "Quantum Biochemistry". Interscience 1963.
15. Voir : GREENSTEIN et WINITZ - "Chemistry of Amino-Acids". J. WILEY and Sons Inc. 1961.
16. C. A. PARKER et W. T. REES - Analyst. 85, 587 (1960).
17. TEALE et WEBER - Biochem. J. 65, 476 (1957).
18. WEBER dans "Light and Life". J. Hopkins Press. 1961.
19. A. WHITE - Biochem. J. 71, 217 (1959).
20. R. W. COWGILL - Archives of Biochem and Biophys. 1, 36 (1963).
21. J. A. GALLY et G. M. EDELMAN - J. of Biopolymers. 1, 367 (1964).
22. J. FEITELSON - J. of Phys. Chem. 68, 391 (1964).
23. B. T. ALLEN et D. J. E. INGRAM - "Free Radicals in Biological Systems" Acad. Press. 1961.
24. G. WEBER et K. ROSENHECK - J. of Biopolymers 1, 333 (1964).
25. G. FASMAN, K. NORDLAND et A. PESCE - J. of Biopolymers 1, 325 (1964)
26. Akiyoshi WADA et Yumiko UENO - J. of Biopolymers 1, 343 (1964).
27. A. M. TROZZOLO, E. WASSERMAN et W. A. YAGER - J. Chim; Phys. sous presse.
28. E. FUJIMORI - B. B. A. 40, 251 (1960).
29. S. S. LEHRER et G. D. FASMAN - J. of Biopolymers. 2, 191 (1964).
30. R. A. UPHALA, L. I. GROSSWEINER, J. J. KATZ - Science 1, 641 (1959).
31. J. NAG-GHAUDHURI et L. AUGENSTEIN - J. Of Biopolymers 1, 441 (1964).
32. R. M. HOCHSTRASSER - Rev. Mod. Phys. 34, 531 (1962).
33. N. TRUBLIN - D. E. S. Paris 1964.
34. N. TRUBLIN, R. SANTUS et M. PTAK - C. R. Acad. Sci. 260, 1134 (1965).
35. A. JOHNSEN - Die anomalen Mischkrystalle. N. JB. Min. 1903. Bd II. S. 93. 138.
36. H. HARTMANN - Z. Physik. Chemie. 217, 375 (1961).
37. J. J. KATZ - Nature, 174, 509 (1954).

38. S. FREED, H.H. TURNBULL, W. SALMRE - Nature, 181, 1731 (1958).
39. L. AUGENSTEIN et J. NAG-GHAUDHURI - Nature, 203, 1145 (1964).
40. D. F. EVANS - 176, 777 (1955).
41. G. N. LEWIS et M. CALVIN - J. Am. Chem. Soc., 67, 1232 (1945).
42. C. A. HUTCHISON et B.W. MANGUM. - J. Chem. Phys. 29, 952 (1958).
43. D. S. Mc CLURE - J. Chem. Phys. 22, 1668 (1954).
44. J.H. VAN DER WAALS et M.S. DE GROOT - Mol. Phys. 2, 333 (1959) et Mol. Phys. 3, 190 (1960).
45. P. KOTTIS et R. LEFEBVRE - J. Chem. Phys. 39, 393 (1963).
46. M. PTAK et P. DOUZOU - Nature 199, 1092 (1963).
47. E.P. GRIBOVA, R.P. EVSTIGNEEVA, A.F. MIRONOV, L.P. KAITCHIN, V.N. LUPGINA, A.K. PISKUNOV - Biofizica. 8, 550 (1963).
48. T. SHIGA et L.H. PIETTE - Photochem. Photobiol. 3, 223, (1964).
49. A.W. HORNIG et J.S. HYDE - Mol. Phys. 6, 33 (1962).
50. E. WASSERMAN, L.C. SNYDER et W.A. YAGER - J. Chem. Phys. 41, 1763 (1964).
51. H.F. HAMEKA et L.J. OOSTERHOFF - Mol. Phys. 1, 358 (1958).
52. M.S. DE GROOT et J.H. VAN DER WAALS - Physica 29, 1128 (1963)
53. M.S. DE GROOT et J.H. VAN DER WAALS - Mol. Phys. 1, 545 (1963).
54. W.A. YAGER, E. WASSERMAN et R.M.R. CRAMER - J. Chem. Phys. 37, 1148 (1962).
55. N. TRUBLIN - Diplôme d'Etudes Supérieures - PARIS.
56. C.F. FOERSTER - Nature, 197, 1199 (1963).
57. A.M. TROZZOLO, E. WASSERMAN et W.A. YAGER - J. Chim. Phys. 61, 1663 (1964).
58. E.V. SHPOLSKII - Soviet Phys. Uspekhi 2, 378, (1959) et 3, 327 (1960).
59. C. THOMSON - J. Chem. Phys. 41, 1 (1964).
60. R.E. KELLOG et R.P. SCHWENKER - J. Chem. Phys. 41, 2860 (1964).
61. A.V. BUETTNER - J. Phys. Chem. 68, 3253 (1964).
62. B.T. ALLEN et D.J.E. INGRAM p. 215 dans "Free Radicals in Biological Systems. Acad. Press. (1961).
63. M. Pierre DOUZOU et M. PTAK - C.R. Acad. Sci. 256, 516 (1963).
64. A.K. PISKUNOV., V.E. KOLMOGOROV, D.N. SHIGORIN, N.V. VEREIN, G.A. OZBROVA - Dokl. Akad. Nauk. 154, 910 (1963).
65. SR. P. J. SULLIVAN et W.S. KOSKI - J. Am. Chem. Soc. 86, 159 (1964).
66. B. SMALLER - Nature, 195, 593 (1962).
67. C. CHACHATY et E. HAYON - Nature, 200, 59 (1963).
68. A.D. Mac LAREN et D. SHUGAR "Photochemistry - of Proteins and Nucleic Acids" Pergamon Press. 1964.
69. V.E. KOLMOGAROV, E.V. BARANOV, A.N. TERENIN - Dokl. Akad. Nauk. 149, 142 (1963).
70. K.S. BAGDASARIAN, V.I. MUROMTEV, E.A. SINITSYNA - Dokl. Akad. Nauk. 152, 349 (1963) et Dokl. Akad. Nauk. 153, 374 (1963).
71. Y.I. KOZLOV, V.I. MUROMTEV, A.K. PISKINOV, D.N. SHIGORIN, G.A. OZEROVA, - Russ. J. Phys. Chem. 37, 2800, (1963).
72. D.N. SHIGORIN, A.K. PISKINOV, G.A. OZEROVA, N.A. SHEGLOVA, N.V. VEREIN - Dokl. Akad. Nauk. 158, 432, (1964).
73. J. JOUSSOT-DUBIEN et R. LESCLAUX - C.R. Acad. Sc. 258. 4260 (1964).
74. P. DOUZOU et M. PTAK - J. Chem. Phys. 1681, (1964).
75. S. KATO, Y. USUI, M. KOLZUMI - Bull. of Chem. Soc. Jap. 36, 1522 (1963).
76. J.E. GILL et M. WEISSBLUTH - Biopolymers 1, 433 (1964).

77. VON KOCH, R., J. FRANZ et K. MARKAU - Atom Press. 9, 345, (1962).
78. DAVYDOV - Theory of molecular excitons Mc Graw Hill Comp. Inc. 1962.
79. M. KATAYAMA et W. GORDY - J. Chem. Phys. 35, 117 (1961).
80. J. E. GILL. - communication personnelle.
81. R. B. JOHNS et D. J. WHELAN - Proceedings of Chem. Soc. 360 (196)
82. O. A. AZEZOVA - Biofizica. 6, 745 (1964).
83. P. DEBYE et J. O. EDWARDS - J. Chem. Phys. 20, 236 (1962).
84. A. CHECCUCCI, K. DEPIREUX, J. DUCHESNE - C. R. Acad. Sci. 259, 1585 (1964).
85. B. SMALLER - J. Chem. Phys. 37, 1578 (1962).
86. VAN DER WAALS et DE GROOT - p. 379 "Magnetic and electric resonance and relaxation". North. Holland publishing Company. 1963.
87. M. S. DE GROOT et J. H. VAN DER WAALS - Mol. Phys. 6, 545 (1963).
88. M. C. LONGUET, HIGGINS et L. SAMEL - Proc. Roy. Soc. A. 251, 172 (1959).
89. A. D. LIEHR - Z. Naturf. A. 16, 641 (1961).
90. S. LEACH et R. LOPEZ DELGADO - J. Chim. Phys. 61, 1636 (1964).
91. B. SMALLER dans Advances in Biological and medical physics p. 255. Academic Press 1963.
92. A. TERENIN et V. ERMOLAIEV - Dokl. Akad. Nauk. 85, 547 (1952).
93. J. B. FARMER, C. L. GARDNER et C. A. Mc DOWELL - J. Chem. Phys. 34, 1058 (1961)
94. S. SIEGEL et K. B. EISENTHAL - J. Chem. Phys. 38, 2785 (1963).
95. F. W. J. TEALE - Biochem. J. 76, 381 (1960)
96. L. STRYER - Rad. Res. Supple. n°2, 432, (1960)
97. V. R. BURGESS - J. Sci. Inst. 38, 98 (1961)
98. W. KOHNLEIN, A. MULLER dans "Free Radicals in Biological Systems". Acad. Press. 1961
99. V. G. V. FÖERSTER - Z. Naturforschg. 15a, 1079 (1960).
100. St. LUKIEWICZ - Sep. Exp. 19, 491 (1963).

*

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"APPLICATIONS DES METHODES DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE A L'ETUDE DES MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE"

Vu et approuvé :

Paris, le 24 Juin 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE

Imp. LATOUR-MAUBOURG
20, rue Augereau - Paris 7ème

Dépôt légal nº 102
4ème trimestre 1965